



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

ALESSANDRA STRAIOTO SALOMÃO

**IMPACTO DA ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTO PSICOESTIMULANTE E DE
DOENÇA NEGLIGENCIADA NA SAÚDE: EFEITOS CARDIOVASCULARES DO
DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA E DA DINÂMICA ESPAÇO-TEMPORAL DA
MORTALIDADE POR LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL**



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

ALESSANDRA STRAIOTO SALOMÃO

**IMPACTO DA ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTO PSICOESTIMULANTE E DE
DOENÇA NEGLIGENCIADA NA SAÚDE: EFEITOS CARDIOVASCULARES DO
DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA E DA DINÂMICA ESPAÇO-TEMPORAL DA
MORTALIDADE POR LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL**

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

Orientadora:

Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli

Coorientadora:

Profa. Dra. Marina Politi Okoshi

636.089
S171i

Salomão, Alessandra Straioto.

Impacto da administração de medicamento psicoestimulante e de doença negligenciada na saúde: efeitos cardiovasculares do dimesilato de lisdexanfetamina e da dinâmica espaço temporal da mortalidade por Leishmaniose Visceral no Brasil / Alessandra Straioto Salomão. – Presidente Prudente, 2026.

130 f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2026.

Bibliografia.

Orientador: Francis Lopes Pacagnelli.

1. Dimesilato de lisdexanfetamina. 2. Remodelamento cardíaco. 3. Leishmaniose visceral. 4. Mortalidade. 5. Saúde pública. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “IMPACTO DA ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTO PSICOESTIMULANTE E DE DOENÇA NEGLIGENCIADA NA SAÚDE: EFEITOS CARDIOVASCULARES DO DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA E DA DINÂMICA ESPAÇO-TEMPORAL DA MORTALIDADE POR LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL”

AUTOR(A): ALESSANDRA STRAIOTO SALOMÃO

ORIENTADOR(A): Profa. Dra. FRANCIS LOPES PACAGNELLI

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR(A) em FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL

Área de Concentração FISIOPATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FRANCIS LOPES PACAGNELLI

Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE - Presidente Prudente (SP)

Profa. Dra. ANA PAULA ALVES FAVARETO

Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE - Presidente Prudente (SP)

Prof. Dr. ROGÉRIO GIUFFRIDA

Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE - Presidente Prudente (SP)

Profa. Dra. GRAZIELA SCALIANI CERAVOLO

Universidade Estadual de Londrina - UEL - Londrina (PR)

Prof. Dr. ELIVELTON DA SILVA FONSECA

Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará - Marabá (PA)

Data da realização: Presidente Prudente, 24 de Setembro de 2026.

Central de Assinaturas Eletrônicas

Sobre o documento

Assunto: Documento eletrônico
Status do documento: Concluído
Data de criação do documento: 30/09/2026 15:45
Fuso horário: (UTC-03:00) Brasília
Número de assinaturas: 5
Solicitante: KEID RIBEIRO KRUGER (#6641170)

Signatários do documento

ROGERIO GIUFFRIDA (PROFESSOR)

rgiuffrida@unoeste.br
Recebido em 30/09/2026 15:45
Assinado em 01/10/2026 14:24
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.131.32.97
ID da assinatura: 7187307

FRANCIS LOPES PACAGNELLI (PROFESSOR)

francispacagnelli@unoeste.br
Recebido em 30/09/2026 15:45
Assinado em 01/10/2026 07:42
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.131.32.97
ID da assinatura: 7187306

ANA PAULA ALVES FAVARETO (PROFESSOR)

anafavareto@unoeste.br
Recebido em 30/09/2026 15:45
Assinado em 30/09/2026 15:47
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 2804:554:24b:3d00:18db:747:bc04:5704
ID da assinatura: 7187308

ELIVELTON DA SILVA FONSECA (SIGNATÁRIO EXTERNO)

elivelton.fonseca@unifesspa.edu.br
Recebido em 30/09/2026 15:45
Assinado em 30/09/2026 22:42
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.55.70.210
ID da assinatura: 7187310

GRAZIELA SCALIANI CERAVALO (SIGNATÁRIO EXTERNO)

gsceravolo@uel.br
Recebido em 30/09/2026 15:45
Assinado em 30/09/2026 15:53
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 101.52.77.83
ID da assinatura: 7187309

Utilize o QRCode abaixo para conferir a autenticidade deste documento:



DEDICATÓRIA

Ao meu amado esposo e à nossa querida filha. Vocês foram o alicerce que sustentou cada passo desta jornada. Nos momentos de cansaço, foram minha força; nos momentos de dúvida, minha esperança; e nos momentos de conquista, minha maior alegria. Obrigada pelo amor, pela compreensão diante das ausências, pela paciência nos dias difíceis e por caminharem ao meu lado durante todos esses anos. Que esta tese represente não apenas a realização de um sonho acadêmico, mas também o testemunho de que os maiores desafios se tornam possíveis quando são vividos com amor, fé e família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, por Seu infinito amor, providência e misericórdia. Agradeço por Sua presença constante ao longo desta caminhada, sustentando-me nos momentos de incerteza, fortalecendo-me diante das dificuldades e conduzindo meus passos até a concretização desta importante etapa. Toda honra e toda glória sejam dadas a Ele.

À Virgem Maria, Mãe amorosa e intercessora fiel, agradeço por seu amparo materno, por sua constante proteção e por me conduzir sempre ao encontro de seu Filho. Nos momentos de fragilidade, encontrei em seu exemplo de humildade, fortaleza e confiança a inspiração necessária para seguir em frente. Que seu olhar materno continue iluminando meus caminhos e guiando meus passos.

À minha família, expresso minha eterna gratidão pelo amor incondicional, apoio irrestrito, compreensão e incentivo durante toda esta trajetória. Vocês são o maior presente que Deus me concedeu, o alicerce sobre o qual construo meus sonhos e minhas conquistas. Em cada desafio superado, encontrei em vocês o acolhimento, a força e a serenidade necessários para prosseguir. Sem a presença amorosa de cada um, esta realização não teria sido possível.

À minha orientadora, Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli, expresso minha mais profunda e sincera gratidão pela orientação segura, pela confiança depositada em mim e pela inestimável contribuição para minha formação acadêmica e humana. Agradeço pela generosidade com que compartilhou seus conhecimentos, pela sensibilidade no exercício da docência e constante disponibilidade ao longo desta trajetória. Sua competência científica, aliada à sua fé e ao compromisso genuíno com a formação de seus orientandos, constitui uma fonte constante de inspiração e admiração. Que Deus, em Sua infinita bondade, continue a abençoar abundantemente sua vida, sua família e sua nobre missão de ensinar, servir e transformar vidas por meio da ciência e do amor ao próximo.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Marina Politi Okoshi, expresso minha sincera gratidão pelas valiosas contribuições científicas e, especialmente, pelo auxílio na condução dos experimentos, que contribuíram significativamente para o

desenvolvimento e a conclusão desta pesquisa. Estendo meus sinceros agradecimentos a toda a equipe da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP-FMB) pelo suporte técnico, colaboração e acolhimento durante a realização das atividades experimentais.

À Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes, da Universidade Estadual de Londrina (UEL) agradeço pela parceria científica, pela contribuição no delineamento experimental deste estudo e pela disponibilização do material biológico que tornou esta pesquisa possível. Estendo meus agradecimentos a toda a sua equipe pelo apoio, colaboração e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, agradeço pela honrosa disponibilidade em participar da avaliação desta tese e pelas valiosas contribuições que certamente enriquecerão este estudo.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), expresso minha gratidão pelos conhecimentos compartilhados, pela excelência acadêmica e pela dedicação à formação de pesquisadores comprometidos com o avanço da ciência.

À coordenadora do Programa, Profa. Dra. Cecília Laposy Santarém, e à vice-coordenadora, Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli, agradeço pela competência, comprometimento e excelência na condução das atividades acadêmicas e administrativas do Programa de Pós-Graduação.

À funcionária Keid Ribeiro Kruger, agradeço pelo suporte administrativo prestado durante o período de realização deste trabalho.

Aos colaboradores desta pesquisa, em especial Karen Galvão Valeriano, Anna Clara Consorti dos Santos, Ana Carolina Biscola Catucci e Gisele Correia da Silva expresso meu sincero agradecimento pela colaboração, disponibilidade e auxílio ao longo das diferentes etapas deste estudo. A participação de vocês foi valiosa para a concretização deste trabalho.

À Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), minha gratidão pela infraestrutura, pelo apoio institucional e pelas oportunidades de crescimento acadêmico, científico e profissional proporcionadas ao longo desta trajetória.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta tese. Cada gesto de apoio, incentivo, colaboração e amizade foi fundamental para que esta conquista se tornasse realidade.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001” pela bolsa concedida.

Meu sincero reconhecimento e profunda gratidão a todos.

*"Em meio às maiores dificuldades, aprendi
que Deus nunca abandona a alma que
n'Ele confia". (Santa Faustina Kowalska)*

RESUMO

Impacto da administração de medicamento psicoestimulante e de doença negligenciada na saúde: efeitos cardiovasculares do dimesilato de lisdexanfetamina e da dinâmica espaço temporal da mortalidade por Leishmaniose Visceral no Brasil

A saúde humana é influenciada por diferentes fatores capazes de impactar o desenvolvimento de doenças e a qualidade de vida da população. Entre eles, destacam-se a administração de substâncias farmacológicas durante períodos críticos do desenvolvimento e a persistência de doenças infecciosas associadas a contextos de vulnerabilidade. Nesse contexto, a presente tese reuniu evidências sobre dois importantes agravos à saúde: os efeitos cardiovasculares associados à administração de dimesilato de lisdexanfetamina durante o período juvenil-puberal e os padrões espaço-temporais da mortalidade por leishmaniose visceral no Brasil. O primeiro estudo investigou os efeitos cardíacos da administração de dimesilato de lisdexanfetamina durante os períodos juvenil e peripuberal em ratos Wistar. Foram avaliados componentes da NADPH oxidase, biomarcadores de estresse oxidativo, proteínas da via MAPK e parâmetros histológicos do ventrículo esquerdo. Observou-se redução da expressão gênica de NOX4, p22phox e p47phox, sem alterações nos biomarcadores de estresse oxidativo. Adicionalmente, verificou-se aumento da expressão proteica de p38-MAPK, maior deposição de colágenos tipos I e III e aumento da dimensão fractal nuclear dos cardiomiócitos. Os resultados demonstram que a administração de dimesilato de lisdexanfetamina durante os períodos juvenil e peripuberal promove remodelamento cardíaco molecular e estrutural, associado à modulação da sinalização redox e da matriz extracelular. O segundo estudo analisou a distribuição temporal e espacial da mortalidade por leishmaniose visceral no Brasil entre 2015 e 2024, utilizando dados do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM/DATASUS). Foram registrados 816 óbitos no período, com tendência significativa de redução da mortalidade. Apesar desse declínio, observou-se distribuição heterogênea dos óbitos, com concentração persistente de áreas de maior risco nas regiões Norte e Nordeste. A

mortalidade foi mais frequente no sexo masculino e em indivíduos de 20 a 59 anos, e as análises espaciais identificaram aglomerados persistentes em estados historicamente vulneráveis, evidenciando desigualdades regionais relacionadas à ocorrência da doença. Embora abordem diferentes problemas de saúde, ambos os estudos contribuem para a compreensão de fatores capazes de influenciar o processo saúde-doença, seja por meio de alterações biológicas decorrentes da administração de substâncias farmacológicas durante o desenvolvimento, seja pela persistência de agravos infecciosos associados a contextos de vulnerabilidade populacional. Os achados fornecem evidências que podem subsidiar a tomada de decisões em saúde, contribuindo para o monitoramento da segurança de terapias farmacológicas, para o direcionamento de ações de vigilância epidemiológica e para o desenvolvimento de políticas públicas voltadas à prevenção de agravos, à promoção da saúde e à redução das desigualdades regionais.

Palavras-chave: dimesilato de lisdexanfetamina; remodelamento cardíaco; leishmaniose visceral; mortalidade; epidemiologia espacial; saúde pública.

ABSTRACT

Impact of psychostimulant drug administration and a neglected disease on health: cardiovascular effects of lisdexamfetamine dimesylate and spatiotemporal dynamics of Visceral Leishmaniasis mortality in Brazil

Human health is influenced by various factors that can affect disease development and population quality of life. Among these, the administration of pharmacological substances during critical periods of development and the persistence of infectious diseases associated with contexts of vulnerability are particularly noteworthy. In this context, the present thesis brought together evidence on two important health conditions: the cardiovascular effects associated with the administration of lisdexamfetamine dimesylate during the juvenile-pubertal period and the spatiotemporal patterns of visceral leishmaniasis mortality in Brazil. The first study investigated the cardiac effects of lisdexamfetamine dimesylate administration during the juvenile and peripubertal periods in Wistar rats. Components of the NADPH oxidase complex, oxidative stress biomarkers, MAPK pathway proteins, and histological parameters of the left ventricle were evaluated. Reduced gene expression of NOX4, p22phox, and p47phox was observed, with no changes in oxidative stress biomarkers. Additionally, increased p38-MAPK protein expression, greater deposition of type I and type III collagen, and increased nuclear fractal dimension of cardiomyocytes were detected. These findings demonstrate that juvenile-pubertal lisdexamfetamine dimesylate administration promotes molecular and structural cardiac remodeling associated with modulation of redox signaling pathways and extracellular matrix remodeling. The second study analyzed the temporal and spatial distribution of visceral leishmaniasis mortality in Brazil between 2015 and 2024 using data from the Mortality Information System (SIM/DATASUS). A total of 816 deaths were recorded during the study period, with a significant downward trend in mortality rates. Despite this decline, mortality remained heterogeneously distributed across the country, with persistent high-risk areas concentrated in the North and Northeast regions. Mortality was more frequent among males and individuals aged 20 to 59 years. Spatial analyses identified persistent clusters

in historically vulnerable states, highlighting regional inequalities associated with the occurrence of the disease. Although they address different health problems, both studies contribute to understanding factors that may influence the health–disease process, either through biological changes resulting from the administration of pharmacological substances during development or through the persistence of infectious diseases associated with contexts of population vulnerability. The findings provide evidence that may support health decision-making, contributing to the monitoring of pharmacological therapy safety, the guidance of epidemiological surveillance actions, and the development of public policies aimed at disease prevention, health promotion, and the reduction of regional health inequalities.

Keywords: lisdexamfetamine dimesylate; cardiac remodeling; visceral leishmaniasis; mortality; spatial epidemiology; public health.

LISTA DE SIGLAS

ARTIGO 1

ADHD	– Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder
APS	– Ammonium persulfate
ARRIVE	– Animal research reporting of in vivo experiments
a.u.	– Arbitrary units
CAT	– Catalase
CDNB	– 1-chloro-2,4-dinitrobenzene
COBEA	– Brazilian College of Animal Experimentation
CT	– Control group
DOHaD	– Developmental Origins of Health and Disease
ERK	– Extracellular signal-regulated kinase
GAPDH	– Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GSH	– Reduced glutathione
GST	– Glutathione transferase
H&E	– Hematoxylin–eosin
JNK	– c-Jun N-terminal kinase
LDX	– Lisdexamfetamine dimesylate
LPO	– Lipid peroxidation
MAPK	– Mitogen-activated protein kinase
mRNA	– messenger RNA
NIH	– National Institutes of Health
NOX	– NADPH oxidase
NOX2	– NADPH oxidase 2
NOX4	– NADPH oxidase 4
p22phox	– p22 phagocyte oxidase
p38MAPK	– p38 mitogen-activated protein kinase
p47phox	– p47 phagocyte oxidase
PBS	– phosphate-buffered saline
PND	– Postnatal days

PSR	– Picrosirius red
RNA	– Ribonucleic acid
ROS	– Reactive oxygen species
RT-qPCR	– Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	– Sodium dodecyl sulfate
SOD	– Superoxide dismutase
TBA	– Thiobarbituric acid
TBARS	– Thiobarbituric acid reactive substances
TBS-T	– Tris-buffered saline with Tween 20
TCA	– Trichloroacetic acid
UEL	– State University of Londrina
VVG	– Verhoeff–Van Gieson

ARTIGO 2

APC	– Variação percentual anual
DATASUS	– Departamento de informática do Sistema Único de Saúde
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LISA	– Indicadores locais de associação espacial
SIH/SUS	– Sistema de informações hospitalares do SUS
SIM	– Sistema de informações sobre mortalidade
STROBE	– Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology
SUS	– Sistema Único de Saúde

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1	Juvenile–pubertal lisdexamfetamine dimesylate administration induces cardiac molecular and structural alterations associated with p38-MAPK activation in rats	
Figura 1 -	Schematic representation of the experimental design.....	28
Figura 2 -	Gene expression of NADPH oxidase subunits assessed by real-time RT-qPCR.....	35
Figura 3 -	Cardiac oxidative profile.....	36
Figura 4 -	Protein expression of MAPK pathway-related proteins in the left ventricle assessed by Western blot.....	37
Figura 5 -	Analysis of cardiomyocyte area.....	38
Figura 6 -	Analysis of cardiac collagen remodeling.....	39
Figura 7 -	Analysis of cardiomyocyte arteriole thickness.....	40
Figura 8 -	Fractal dimension analysis of cardiac nuclear structure.....	41
Figura 9 -	Proposed graphical summary of the effects of lisdexamfetamine dimesylate (LDX) administration during the juvenile-pubertal period on the left ventricle.....	42
 ARTIGO 2	 Leishmaniose visceral no Brasil: análise temporal e espacial da mortalidade 2015-2024	
Figura 1 -	Variação percentual anual da taxa de mortalidade por leishmaniose visceral (100 mil habitantes) 2015-2024.....	73
Figura 2 -	Distribuição por densidade da mortalidade por leishmaniose visceral, 2015-2024.....	74
Figura 3 -	Autocorrelação espacial local da mortalidade por leishmaniose visceral nos municípios brasileiros segundo o índice de Moran local (LISA), 2015–2024.....	75
Figura 4 -	Distribuição espacial dos aglomerados da mortalidade por leishmaniose visceral segundo estatística de varredura espacial, Brasil, 2015-2024.....	76
Figura 5 -	Relação espacial entre as taxas de mortalidade e internações por leishmaniose visceral 2015-2024.....	77

SUMÁRIO

ARTIGO 1	Juvenile–pubertal lisdexamfetamine dimesylate administration induces cardiac molecular and structural alterations associated with p38-MAPK activation in rats..	21
	INTRODUÇÃO.....	25
	MÉTODOS.....	27
	RESULTADOS.....	34
	DISCUSSÃO.....	41
	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	52
ARTIGO 2	Leishmaniose visceral no Brasil: análise temporal e espacial da mortalidade 2015-2024.....	63
	INTRODUÇÃO.....	64
	MÉTODOS.....	64
	RESULTADOS.....	66
	DISCUSSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS.....	71
ANEXO A	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	78
ANEXO B	INSTRUÇÕES PARA AUTORES DA REVISTA LIFE SCIENCES (ARTIGO 1).....	79
ANEXO C	INSTRUÇÕES PARA AUTORES DA REVISTA EPIDEMIOLOGIA E SERVIÇOS DE SAÚDE (ARTIGO 2)....	111
APÊNDICE A	SUPPLEMENTARY FIGURES S1, S2 AND S3	
	UNCROPPED ORIGINAL WESTERN BLOT MEMBRANES	129

IMPACTO POTENCIAL DESSA PESQUISA

Esta tese apresenta relevância científica por contemplar duas investigações distintas na área da saúde. A primeira avaliou os efeitos cardiovasculares associados à administração de dimesilato de lisdexanfetamina durante o período juvenil-puberal, enquanto a segunda analisou os padrões espaço-temporais da mortalidade por leishmaniose visceral no Brasil.

O estudo experimental possui relevância devido ao amplo uso do dimesilato de lisdexanfetamina no tratamento do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), especialmente em crianças e adolescentes. Os resultados demonstraram alterações em vias relacionadas à sinalização redox, aumento da expressão de p38-MAPK e remodelamento estrutural cardíaco, ampliando a compreensão dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos nas respostas cardiovasculares ao fármaco durante uma fase crítica do desenvolvimento e fornecendo subsídios para futuras pesquisas experimentais e translacionais.

O estudo epidemiológico contribuiu para a compreensão dos padrões temporais e espaciais da mortalidade por leishmaniose visceral no Brasil, identificando áreas de maior vulnerabilidade e persistência da doença. Os resultados fornecem subsídios para o aprimoramento das ações de vigilância epidemiológica, o planejamento de políticas públicas e o direcionamento de medidas de prevenção e controle, especialmente em regiões historicamente mais afetadas.

Sob a perspectiva social, ambas as pesquisas contribuem para a promoção da saúde e para a melhoria da qualidade de vida da população. Enquanto o estudo experimental amplia o conhecimento sobre possíveis repercussões cardiovasculares associadas ao uso de medicamentos amplamente prescritos, o estudo epidemiológico fornece informações relevantes para o enfrentamento de uma doença que permanece como importante problema de saúde pública no país.

Quanto ao impacto tecnológico e de inovação, o estudo experimental contribui para a identificação de vias moleculares potencialmente envolvidas nas respostas cardíacas ao dimesilato de lisdexanfetamina, podendo favorecer o desenvolvimento futuro de estratégias de monitoramento cardiovascular, bem como a identificação de biomarcadores relacionados ao remodelamento cardíaco e à sinalização redox. Por sua vez, o estudo epidemiológico demonstra a aplicabilidade de técnicas avançadas de análise espacial e temporal para a identificação de áreas de maior risco e vulnerabilidade à leishmaniose visceral, fornecendo subsídios para o aprimoramento das ações de vigilância epidemiológica e do planejamento em saúde pública.

As pesquisas desenvolvidas nesta tese encontram-se alinhadas principalmente ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3 – Saúde e Bem-Estar, da Organização das Nações Unidas (ONU), ao contribuir para a produção de conhecimento científico voltado à prevenção de doenças, ao uso seguro e racional de medicamentos, ao aprimoramento da vigilância epidemiológica e à promoção da saúde da população. Adicionalmente, os resultados dialogam com o ODS 10 – Redução das Desigualdades, ao evidenciar disparidades regionais associadas à mortalidade por leishmaniose visceral no Brasil, e com o ODS 9 – Indústria, Inovação e Infraestrutura, por meio da aplicação de metodologias avançadas de análise espacial e da geração de conhecimento que poderá subsidiar o desenvolvimento de estratégias inovadoras de monitoramento cardiovascular e vigilância em saúde.

ARTIGO 1

Juvenile–pubertal lisdexamfetamine dimesylate administration induces cardiac molecular and structural alterations associated with p38-MAPK activation in rats

Alessandra Straioto Salomão^a, Ana Carolina Biscola Catucci^b, Gisele Correia da Silva^b, Camila Fernandes de Oliveira^c, Anna Clara Consorti dos Santos^d, Carolina Rodrigues Tonon^d, Luana Urbano Pagan^d, Giovanna Fachetti Frigoli^e, João Vinícius Honório da Silva^e, Glaura Scantamburlo Alves Fernandes^e, Marina Politi Okoshi^d, Francis Lopes Pacagnelli^{a,b,c}

^a Postgraduate Program in Animal Science, University of Western São Paulo (UNOESTE), Raposo Tavares Highway, Km 572, Limoeiro, Presidente Prudente, SP 19067-175, Brazil

^b Faculty of Health Sciences, Physiotherapy Program, UNOESTE José Bongiovani Street, 700, Presidente Prudente, SP 19050-680, Brazil

^c Faculty of Health Sciences, Medicine Program, UNOESTE, José Bongiovani Street, 700, Presidente Prudente, SP 19050-680, Brazil

^d Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro Avenue, s/n, Botucatu, SP 18618-687, Brazil

^e Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Celso Garcia Cid Highway, PR 445, Km 380, Londrina, PR 86057-970, Brazil

Correspondence: Francis Lopes Pacagnelli, UNOESTE, Raposo Tavares Highway, Km 572, Limoeiro, Presidente Prudente, SP 19067-175, Brazil.

Phone: +55 18 3229-2000

E-mail: francispacagnelli@unoeste.br

O estudo está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: Life Sciences (Elsevier), percentil de 98% na Scopus.

ABSTRACT

Aims: This study aimed to investigate the cardiac effects of juvenile-pubertal LDX administration in Wistar rats by assessing NADPH oxidase subunit gene expression, oxidative stress biomarkers, MAPK pathway-related protein expression, and myocardial histological and structural alterations.

Materials and Methods: Male Wistar rats aged 22 days were allocated to control (CT, n=7) and LDX-treated (n=7) groups. Treatment was administered throughout the juvenile and peripubertal periods, and animals were euthanized on postnatal day 66. Left ventricular samples were analyzed for NADPH oxidase subunit gene expression by RT-qPCR, oxidative stress biomarkers by biochemical assays, MAPK-related protein expression by Western blot, and histological parameters including cardiomyocyte morphology, collagen quantification, arteriolar thickness, and fractal dimension.

Results: LDX reduced the expression of NOX4 ($p=0.047$), p22phox ($p<0.0001$), and p47phox ($p=0.021$), whereas NOX2 expression remained unchanged. Oxidative stress biomarkers were unchanged. P38-MAPK protein expression increased in the LDX group ($p=0.008$), whereas ERK and JNK remained unchanged. Structural analyses demonstrated increased left ventricular type I ($p=0.0006$) and type III ($p=0.007$) collagen deposition and a higher cardiomyocyte nuclear fractal dimension ($p=0.0006$).

Conclusions: LDX administration during youth and puberty promoted molecular and structural cardiac remodeling, characterized by redox modulation, p38-MAPK activation, and reorganization of cardiomyocyte nuclear architecture and extracellular matrix components. Administration of LDX during this critical developmental window may increase susceptibility to cardiovascular disease in adulthood, consistent with the DOHaD concept.

Keywords: lisdexamfetamine dimesylate; cardiovascular system; attention deficit disorder with hyperactivity; rat.

HIGHLIGHTS

- LDX reduced NADPH oxidase subunit gene expression in the heart
- LDX treatment increased p38-MAPK protein expression
- Pubertal LDX administration altered cardiomyocyte nuclear architecture

1. INTRODUCTION

Lisdexamfetamine dimesylate (LDX) is a psychostimulant widely used for the treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD), particularly when methylphenidate is ineffective [1–3]. LDX acts as a prodrug of dextroamphetamine, increasing dopaminergic and noradrenergic neurotransmission and exerting sympathomimetic effects [4]. However, this pharmacological mechanism has been associated with cardiovascular alterations, including tachycardia, arterial hypertension, and increased myocardial contractility, which may contribute to cardiac remodeling [4,5]. These alterations are particularly relevant because LDX is commonly administered during childhood and puberty, a period characterized by intense physiological remodeling and hormonal influences that may negatively affect the heart [6–9].

Experimental studies have demonstrated the development of cardiomyopathy with myocardial lesions, including cellular degeneration, myocytolysis, and contraction band formation in the subendocardium, following subcutaneous administration of methamphetamine hydrochloride (3 mg·kg⁻¹·d⁻¹) for 8 weeks in male rats [10]. In another experimental model of repeated methamphetamine administration in rats, left ventricular dilation and systolic and diastolic dysfunction were observed [11]. A study conducted in male rhesus monkeys receiving intravenous methamphetamine administration demonstrated a significant reduction in ejection fraction 12 weeks after drug administration [12]. Administration of amphetamine-type stimulants may trigger cardiotoxic effects, among which stimulant-associated cardiomyopathy is particularly notable [10]. Among the deleterious effects induced by amphetamines are accelerated apoptosis, cardiomyocyte necrosis, alterations in myocardial perfusion, abnormal synthesis and function of cardiac proteins, dysregulation of intracellular calcium homeostasis, and oxidative stress [13].

Amphetamine-type stimulants promote oxidative stress through catechol metabolism, leading to orthoquinone formation and generation of reactive oxygen and nitrogen species via redox cycling. This process induces hyperthermia, mitochondrial dysfunction, leukocyte activation, and increased xanthine oxidase

activity, which acts as a source of free radicals, resulting in oxidative injury to cardiomyocytes [14]. Oxidative stress impairs myocardial integrity and function, negatively affecting excitation–contraction coupling and calcium signaling mechanisms in cardiomyocytes [13,14]. Oxidative stress is a mediator of cardiac hypertrophy and remodeling [15]. One of the major sources of myocardial reactive oxygen species (ROS) involved in the development of cardiac hypertrophy is NADPH oxidase (NOX) [16]. Increased ROS production promotes activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, which plays an important role in oxidative stress-induced cardiac hypertrophy and remodeling [16].

Cardiac remodeling involves not only molecular signaling pathways but also structural alterations in cardiomyocytes, the extracellular matrix, and the vasculature. Extracellular matrix remodeling is characterized by modifications in the balance and distribution of collagen fibers, particularly types I and III, which are essential for maintaining cardiac structural integrity and function [17,18]. In addition, cardiovascular remodeling may involve vascular adaptations, including changes in arteriolar structure and wall thickness, which can influence tissue perfusion and cardiac function [19,20]. Furthermore, alterations in cardiomyocyte morphology and nuclear organization have been associated with cellular adaptation to stress and pathological remodeling processes, reflecting changes in myocardial structural organization [21,22]. Therefore, the assessment of myocardial and vascular histological parameters may provide important insights into the cardiac effects of psychostimulant administration during critical stages of development.

Understanding the cardiovascular repercussions associated with psychostimulant use in ADHD is essential to correlate experimental findings with clinical manifestations, particularly during puberty, a critical period of cardiac development. Therefore, elucidating the effects of these substances on the heart during sensitive stages of growth is of considerable importance. In this context, the concept of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) proposes that environmental conditions and exposures during critical periods of development may influence organ structure and function and, consequently, affect health and

disease risk throughout life [23]. Based on this concept, early-life alterations may program cardiovascular outcomes in adulthood. Thus, it was hypothesized that LDX administration during puberty in Wistar rats induces cardiac remodeling through modulation of the myocardial redox environment and activation of the MAPK pathway, thereby affecting cardiomyocyte structure.

This study aimed to investigate the cardiac effects of juvenile-pubertal LDX administration in Wistar rats by assessing NADPH oxidase subunit gene expression, oxidative stress biomarkers, MAPK pathway-related protein expression, and myocardial histological and structural alterations.

2. MATERIALS AND METHODS

The study was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil (Protocol N° 82/2019). All experimental procedures were performed in accordance with the principles of laboratory animal care established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [24]. The study adhered to the Animal Research Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines [25].

2.1. Experimental design

Fourteen male Wistar rats, aged 22 days at the beginning of the experiment, were obtained from the Central Vivarium of the State University of Londrina (UEL) and randomly allocated into two experimental groups (n= 7 animals per group): immediate control group and lisdexamfetamine group. The animals received lisdexamfetamine dimesylate at a dose of 11.3 mg/kg/day, diluted in 0.9% saline, by oral gavage for 40 consecutive days. This dose is equivalent to the administration of a 70 mg capsule of the drug to a child weighing approximately 24 kg and corresponds to 1.13% of the oral LD 50 in rats (oral LD50 in rats > 1000 mg/kg) [26,27]. The control group received only the vehicle (0.9% saline) in an equivalent volume. The treatment period occurred between postnatal days (PND) 25 and 65, corresponding to the juvenile and peripubertal phases in Wistar rats

[28,29]. The animals were housed in cages containing a maximum of three animals per cage and had free access to food and water *ad libitum*. The vivarium was maintained under controlled temperature conditions (23 ± 2 °C) and a 12 h light–dark cycle, with the light phase beginning at 7:00 a.m.

On the 41st experimental day (postnatal day [PND] 66), the rats were anesthetized by isoflurane inhalation and euthanized by cardiac puncture for blood collection into heparinized tubes (sodium heparin). The left ventricle was sectioned, with one portion immediately snap-frozen and the remaining portion fixed in formalin for further analyses. Analyses included assessment of the redox profile through biochemical assays and reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), evaluation of proteins involved in the MAPK pathway, and histological analyses, including collagen quantification and fractal and arteriolar dimensions. Details of the experimental design (Fig. 1) are provided below.

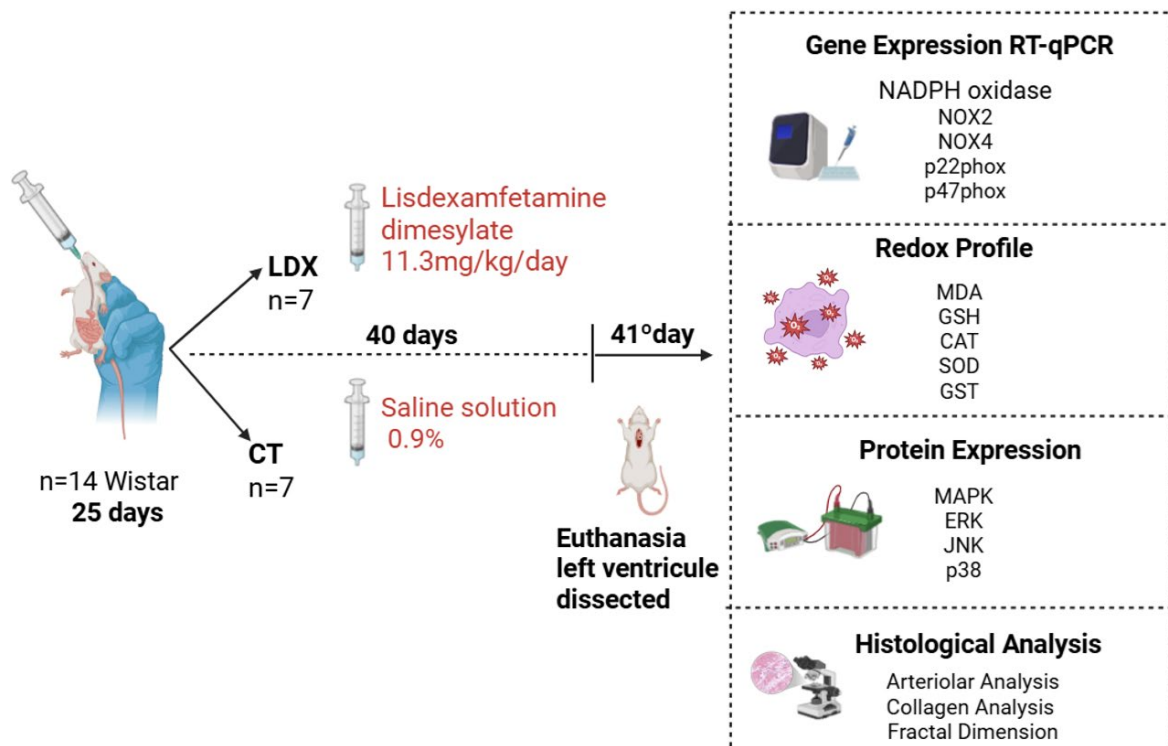


Figure 1. Schematic representation of the experimental design. Created in BioRender.com.

2.2. Real-time RT-qPCR analysis of NADPH oxidase complex gene expression

Relative messenger RNA (mRNA) expression levels of the NADPH oxidase subunits (NOX2, NOX4, p22phox, and p47phox) were quantified using real-time RT-qPCR. Total RNA (ribonucleic acid) was extracted from the left ventricle using TRIZOL® reagent (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and a Precellys® 24 homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France), according to the manufacturer's instructions [30,31]. Total RNA concentrations were determined using a spectrophotometer (NanoDrop Eight, Thermo Scientific, River Oaks Parkway, San Jose, CA, USA) based on absorbance values at 260 nm and expressed as ng/μL. Samples were assessed for the 260/280 ratio, which was approximately 2.0. The integrity of total RNA from each sample was assessed by capillary electrophoresis by determining the RNA Integrity Number (RIN) using the Agilent RNA 6000 Nano Kit on a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA). Reverse transcription was performed after RNA treatment with DNase I (Thermo Scientific), according to the manufacturer's instructions. Briefly, complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 μg of total RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Master Mix (Applied Biosystems, USA). For each 1 μg of treated RNA (10 μL final volume), 10 μL of a reaction mixture containing 10 μL of 2× RT Buffer and 1 μL of 20× RT Enzyme Mix was added. The solution was homogenized and incubated in a thermocycler under the following conditions: 37 °C for 60 min, 95 °C for 5 min, and 4 °C until complete cooling. Samples were stored at -20 °C until use in the real-time PCR (qPCR) assays. Amplification of NOX2, NOX4, p22phox, and p47phox was performed by qPCR using a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Thermo Scientific), and the respective TaqMan assays for each target gene. The total reaction volume was 10 μL, consisting of 2.0 μL of cDNA, 5 μL of TaqMan Gene Expression Master Mix (2×), 0.5 μL of TaqMan Assay (20×), and 2.5 μL of ultrapure water. The reactions were performed under the following conditions: 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing/extension at 60 °C for 1 min. Fluorescence signals were

acquired during the annealing/extension step of each amplification cycle (60 °C for 1 min). Relative gene expression (fold change; $2^{-\Delta\Delta Ct}$) was calculated by normalization to the Ct (threshold cycle) values of the reference genes cyclophilin (Rn00690933_m1) and GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Rn01775763_g1).

2.3. Oxidative stress biomarkers

Left ventricular tissue was homogenized in 1mL of phosphate buffer (pH 7.4) and centrifuged at 9500 g for 10 min at 4 °C. Protein concentration was determined using the Bradford method [32], and samples were adjusted to 1 mg/mg protein for subsequent analyses. Oxidative profile was assessed by evaluating lipid peroxidation and antioxidant defense parameters.

2.4. Lipid peroxidation (LPO)

Lipid peroxidation was evaluated as an indirect measure of peroxide production, reflecting the extent of oxidative damage [33]. LPO levels were determined using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, with absorbance readings at 535 and 572 nm [34]. For the assay, 50 µL of each normalized sample were added in duplicate to a microplate, followed by the addition of FeCl₃ (1 M), trichloroacetic acid (TCA), and thiobarbituric acid (TBA). Samples were mixed and incubated in a water bath at 90 °C for 15 min. Subsequently, the plate was cooled to stop the reaction, and absorbance was measured at 535 and 572 nm.

2.5. Reduced glutathione (GSH)

Reduced glutathione (GSH) concentrations were determined according to the method described by Rahman et al. [35], with minor modifications. The left ventricular homogenate supernatant was reacted with 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), leading to the formation of a yellow-colored product. Absorbance was measured at 412 nm, and the results were expressed as µmol/mg protein.

2.6. Catalase (CAT) activity

Catalase (CAT) activity was evaluated based on the degradation of hydrogen peroxide into water and oxygen. Following protein normalization (1.0 mg/mL in phosphate-buffered saline [PBS]), 297 µL of reaction medium were

added in triplicate to a UV4 microplate, and absorbance was monitored at 240 nm for 60 s [36].

2.7. Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD enzymatic activity was assessed according to the method described by Senthilkumar et al. [37]. The assay was performed using homogenates normalized to 1 mg/mL protein. The reaction medium consisted of sodium carbonate buffer (50 mM, pH 10.2), nitro blue tetrazolium (NBT, 96 μ M), and Triton X-100 (0.6%), followed by incubation for 2 min with sodium hydrochloride. Hydroxylamine ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) (20 mM, pH 6.0). The final reaction volume was adjusted to 200 μ L. The assay was based on the quantification of complexes generated by superoxide anions after the addition of NBT and $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$. Reduction of NBT in the yellow-colored reaction medium resulted in the formation of a bluish compound, which was measured at 560 nm for 2 min at 15-s intervals [34].

2.8. Glutathione transferase (GST) activity

Glutathione S-transferase activity (GST) in the left ventricle was evaluated by measuring thioether formation generated from the conjugation of GSH with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). Changes in absorbance associated with thioether production were monitored at 340 nm for 5 min at 40 s intervals in reaction medium containing 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), 1.5 mM GSH, and 2 mM CDNB, according to the method described by Keen et al. [38]. Results were expressed as μ M thioether formed/min/mg protein.

2.9. Western blot

Protein expression of the hypertrophic MAPK pathway proteins, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), and p38 mitogen-activated protein kinase (p38), was evaluated by Western blot. Protein samples were diluted in Laemmli buffer (240 mM Tris-HCl, 0.8% SDS, 40% glycerol, 0.02% bromophenol blue, and 200 mM β -mercaptoethanol) and separated by electrophoresis using a Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The electrophoretic run was performed using a biphasic gel system composed of a stacking gel (240 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% polyacrylamide, ammonium persulfate (APS), and TEMED) and a resolving gel

(240 mM Tris-HCl, pH 8.8, 30% polyacrylamide, APS, and TEMED), at concentrations ranging from 6% to 10%, according to the molecular weight of the analyzed protein. The electrophoretic run was carried out at 120 V (PowerPac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for approximately 3 h using running buffer (0.25 M Tris, 192 mM glycine, and 1% sodium dodecyl sulfate [SDS]). Subsequently, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using a Mini-Trans Blot system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, and 0.1% SDS). Non-specific binding sites of the primary antibody on the membrane were blocked by incubation with a 0.5% nonfat dry milk solution diluted in Tris-buffered saline with Tween 20 [TBS-T], pH 7.4 (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, and 0.1% Tween 20), for 120 min at room temperature under constant agitation. Subsequently, the membrane was washed three times with basal solution (1 M Tris, pH 2.8, 5 M NaCl, and Tween 20) and incubated with the primary antibody diluted in blocking solution under constant agitation for 12 h. After primary antibody incubation, the membrane was incubated with the secondary antibody diluted in blocking solution for 2 h. Subsequently, immunodetection was performed using the chemiluminescence method according to the manufacturer's instructions (Enhanced Chemiluminescence, Amersham Biosciences, NJ, USA). Nitrocellulose membranes were exposed to X-Omat AR autoradiographic films (Eastman Kodak Co., USA) for standardized exposure times specific to each analyzed protein. Quantitative analysis of the blots was performed using Scion Image software (Scion Corporation, Frederick, MD, USA). Results were normalized to those obtained for the GAPDH protein (6C5 sc-32233, Santa Cruz Biotechnology).

2.10. Histological analysis

Heart tissue samples were fixed in 10% buffered formalin for 48 h. Following fixation, the tissues were embedded in paraffin blocks, enabling coronal histological analysis of 4 μ m sections for cardiac tissue. Histological sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) to measure the cross-sectional areas of cardiomyocytes. Digital images were captured using a LEICA microscope (model DM750, Germany) and transferred to a computer for analysis with the Leica

Application Suite LAS 4.2.0 image analysis system (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA) [39–41]. Images were obtained using a light microscope with binocular optics, and all images were captured with a video camera at 400× magnification (40× objective). Four left ventricular sections per animal were obtained from different fields, and the selected images were analyzed in regions with the greatest number of cells in cross-section [39,41,42].

Histological sections of the left ventricle were stained with picrosirius for collagen visualization. Images of the cardiac tissue were captured using a computer coupled to a video camera. Digital images obtained with a LEICA DM LS microscope (model DM750, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) were transferred to a computer equipped with Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). The red staining corresponding to collagen (picrosirius) was converted to blue to determine the percentage of collagen relative to the total image area. Ten histological fields from each animal were analyzed at 400× magnification using a 40× objective. The selected fields were located away from the perivascular region. Picrosirius staining observed under polarized light allowed the differentiation of type I collagen (red) and type III collagen (green). We used Image J software to measure the medium of coloration of these collagens in relation to the total image area [43].

2.10.1. Arteriolar Wall Thickness Analysis

For arteriolar evaluation, the Verhoeff–Van Gieson (VVG) staining technique was used, and arteriolar wall thickness was measured at 400× magnification. Four measurements were obtained from each arteriole, and four arterioles were analyzed per animal [44].

2.11. Fractal dimension

Fractal dimension analysis was performed on left ventricular sections stained with both Picrosirius Red (PSR) and hematoxylin–eosin (H&E). For each animal, three images were obtained at 400× magnification to assess fibrosis in PSR-stained sections and nuclear organization in H&E-stained sections. Fractal dimension was determined using the box-counting method with ImageJ® software from the US National Institutes of Health (NIH) freely available online at

(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The software employs the box-counting method as a two-dimensional analysis to quantify pixel distribution within a given area, without considering image texture. Using this method, two images presenting the same pixel distribution exhibit identical fractal dimension values, regardless of whether the image is binarized or displayed in grayscale. Thus, fractal dimension values obtained using ImageJ® range from 0 to 2 [45–47].

2.12. Data analysis

Normality of data distribution was evaluated using the Shapiro–Wilk test. Normally distributed data were analyzed using the unpaired Student's t-test, whereas non-normally distributed data were analyzed using the Mann–Whitney U test. Results are presented as mean $\pm$ standard deviation or median (minimum–maximum). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software, and significance was established at $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. LDX downregulates NADPH oxidase subunit gene expression in the left ventricle

The effects of pubertal LDX administration on the expression of NADPH oxidase subunits, recognized as major enzymatic sources of reactive oxygen species in the myocardium, were assessed by RT-qPCR analysis (Fig. 2). LDX administration significantly reduced NOX4 ($p = 0.047$), p22phox ($p < 0.0001$), and p47phox ($p = 0.021$) gene expression compared with CT animals. In contrast, NOX2 expression remained unchanged between experimental groups.

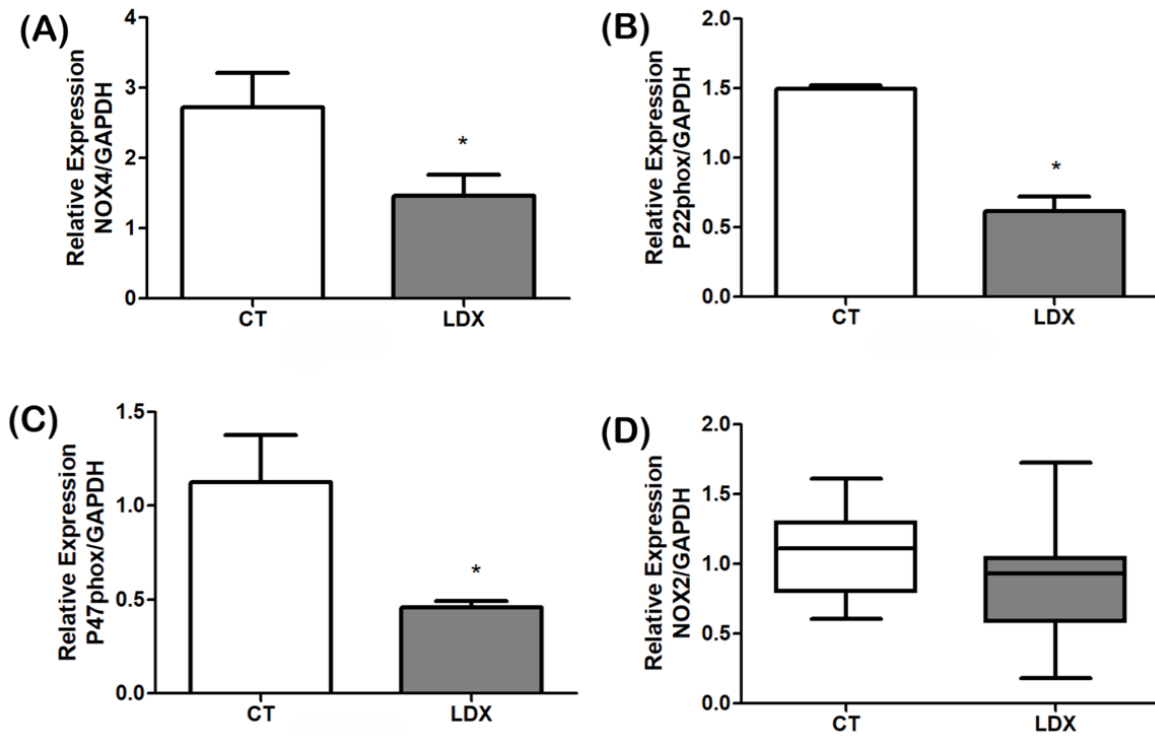


Figure 2. Gene expression of NADPH oxidase subunits assessed by real-time RT-qPCR. CT: control group; LDX: lisdexamfetamine dimesylate-treated group. Gene expression was normalized to the housekeeping gene GAPDH. (A) NOX4. (B) p22phox. (C) p47phox. (D) NOX2. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation or median and interquartile range. Unpaired t-test and Mann–Whitney test (* $p < 0.05$).

3.2. LDX does not alter cardiac oxidative stress biomarkers and antioxidant defenses

The effects of LDX administration on cardiac oxidative stress biomarkers and antioxidant defenses were evaluated by assessing lipid peroxidation and antioxidant parameters (Fig. 3). Analysis of TBARS demonstrated that LDX administration did not increase lipid peroxidation in the left ventricle, suggesting the absence of detectable oxidative damage to cardiomyocyte membranes (Fig. 3A). Likewise, antioxidant defense parameters remained unchanged following LDX treatment, with no significant differences in GSH levels (Fig. 3B), catalase activity

(Fig. 3C), GST activity (Fig. 3D), or SOD activity (Fig. 3E) between experimental groups.

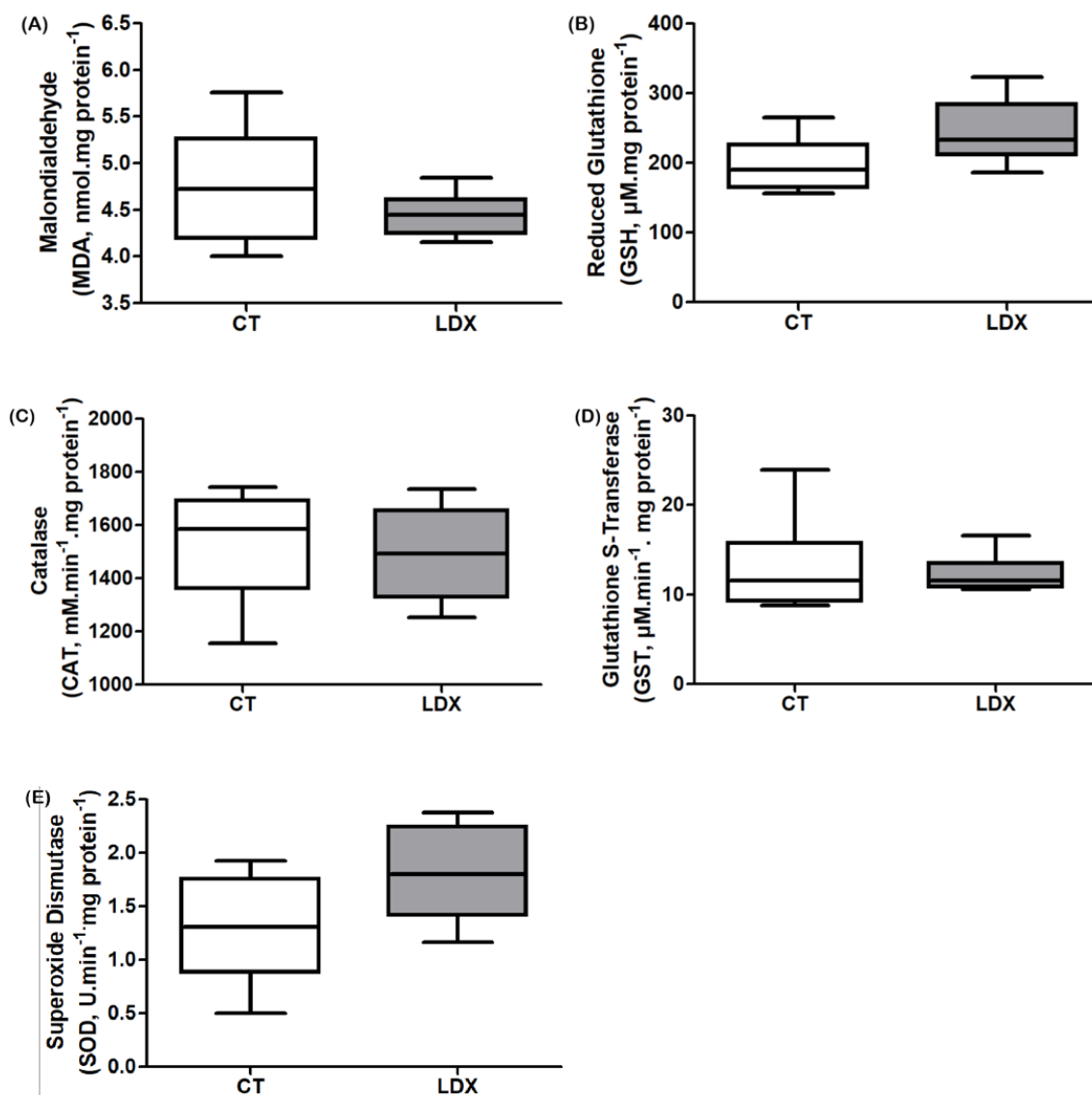


Figure 3. Cardiac oxidative profile. (A) Malondialdehyde concentration. (B) Reduced glutathione (GSH) levels. (C) Catalase (CAT) activity. (D) Glutathione S-transferase (GST) activity. (E) Superoxide dismutase (SOD) activity. CT: control group. LDX: lisdexamfetamine dimesylate-treated group. Data are expressed as median and interquartile range. Mann–Whitney test.

3.3. LDX selectively increases p38-MAPK protein expression in the left ventricle

Western blot analysis was used to investigate the effects of LDX administration on MAPK pathway-related protein expression in the left ventricle. p38-MAPK protein expression was significantly higher in LDX-treated animals than in the CT group ($p = 0.008$). However, no significant differences were observed in JNK or ERK protein expression between groups (Fig. 4).

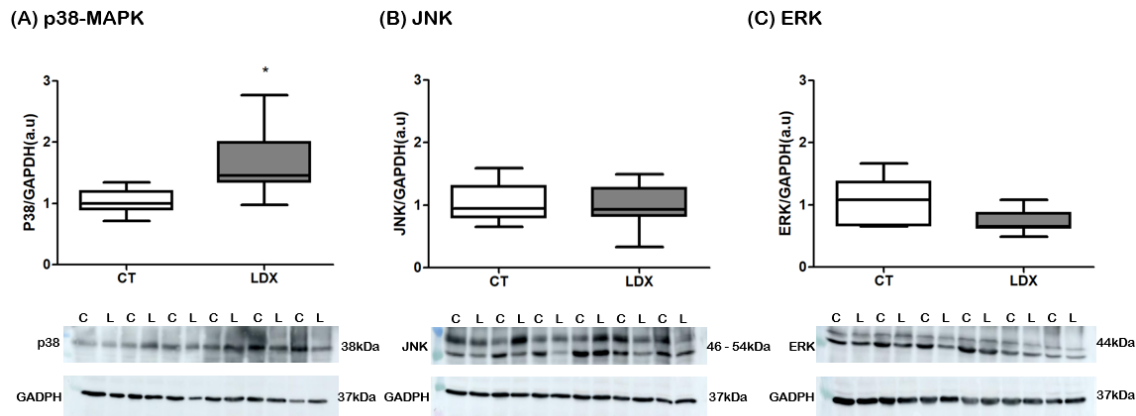


Figure 4. Protein expression of MAPK pathway-related proteins in the left ventricle assessed by Western blot. (A) p38-MAPK protein expression. (B) JNK protein expression. (C) ERK protein expression. Representative immunoblots and densitometric analyses are shown for each protein. p38-MAPK protein expression was significantly increased in the LDX group, whereas no significant differences were observed for JNK and ERK expression. GAPDH was used as an internal control for normalization. C: control group; L: lisdexamphetamine dimesylate-treated group. CT: control group ($n = 5$); LDX: lisdexamphetamine dimesylate-treated group ($n = 7$); a.u.: arbitrary units. Data are expressed as median and interquartile range. Mann–Whitney test, $*p < 0.05$. Full-length blots are provided in Supplementary Figures S1, S2 and S3.

3.4 LDX does not alter cardiomyocyte cross-sectional area

The effects of LDX administration during puberty on cardiomyocyte morphology were assessed by measuring the cross-sectional area of cardiac fibers (Fig. 5). No significant differences in cardiomyocyte cross-sectional area were observed between the experimental groups (CT: $261.7 \pm 102.2 \mu\text{m}^2$ vs. LDX: 258.5

$\pm 128.9 \mu\text{m}^2$; $p = 0.95$), indicating that LDX administration did not induce cardiomyocyte hypertrophy.

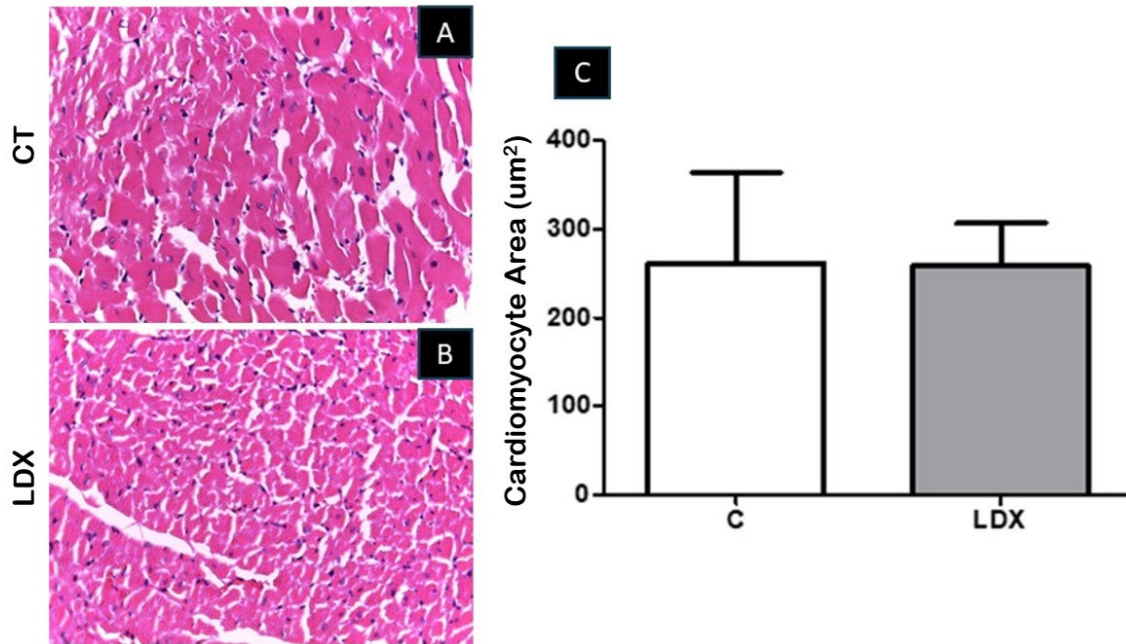


Figure 5. Analysis of cardiomyocyte area. (A) Hematoxylin and eosin (HE)-stained section from the CT group. (B) HE-stained section from the LDX group. Images were acquired at 40 $\times$ magnification. (C) Cross-sectional area of left ventricular cardiomyocytes. CT: control group; LDX: lisdexamfetamine dimesylate-treated group. Unpaired t-test.

3.5 LDX increases type I and type III collagen deposition in the left ventricle

The effects of LDX administration during puberty on cardiac collagen remodeling were evaluated by collagen quantification and fractal dimension analysis (Fig. 6). No significant differences were observed in total collagen deposition between the experimental groups ($p = 0.39$). However, LDX administration increased type I collagen deposition ($p = 0.0006$) and type III collagen deposition ($p = 0.007$). In contrast, collagen fractal dimension did not differ between groups ($p = 0.9$).

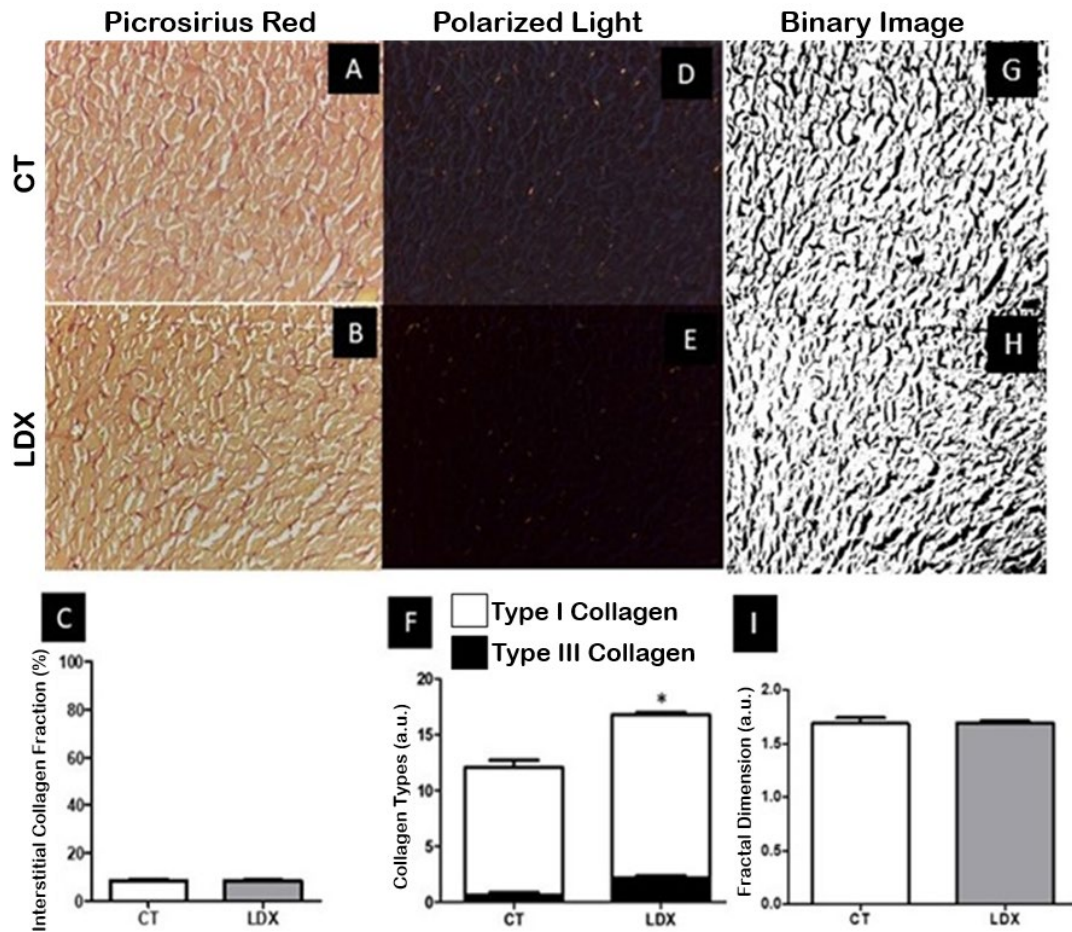


Figure 6. Analysis of cardiac collagen remodeling. (A) Representative Picrosirius-stained section from the CT group. (B) Representative Picrosirius-stained section from the LDX group under polarized light microscopy. (C) Left ventricular collagen interstitial fraction analysis. (D) Representative polarized Picrosirius image from the CT group. (E) Representative polarized Picrosirius image from the LDX group. (F) Collagen types I and III quantification. (G) Representative binarized Picrosirius image from the CT group. (H) Representative binarized Picrosirius image from the LDX group. (I) Fractal dimension analysis. Images were acquired at 40× magnification. CT: control group; LDX: lisdexamphetamine dimesylate-treated group. Unpaired t-test.

3.6 LDX does not alter arteriole wall thickness

The effects of LDX administration during puberty on cardiac arteriole morphology were assessed by measuring arteriole wall thickness (Fig. 7). No

significant differences in arteriole thickness were observed between the experimental groups (CT: $23.65 \pm 3.91 \mu\text{m}$ vs. LDX: $19.89 \pm 3.53 \mu\text{m}$; $p = 0.08$), indicating that LDX administration did not induce vascular structural alterations in the evaluated tissue.

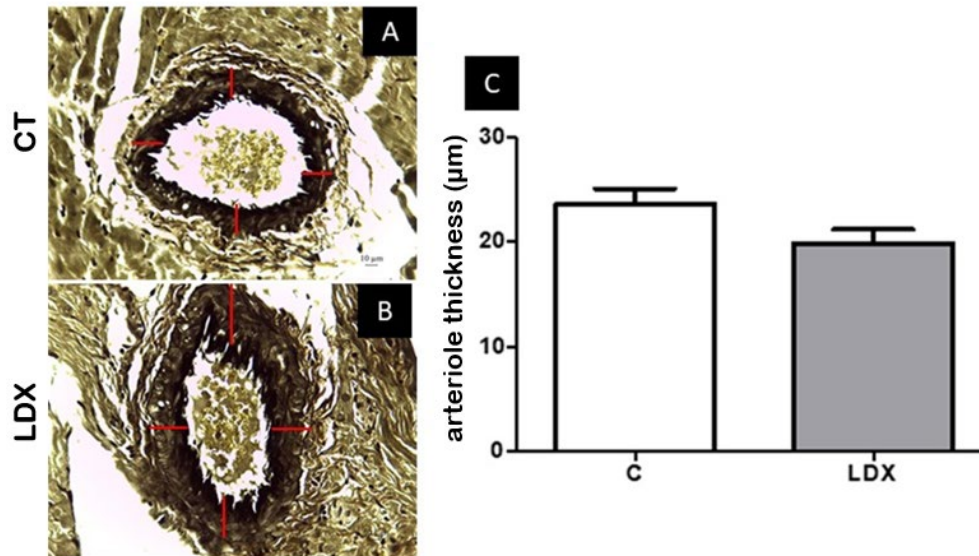


Figure 7. Analysis of cardiomyocyte arteriole thickness. (A) Representative VVG-stained arteriole from the CT group showing the assessment of four wall thickness measurements. (B) Representative VVG-stained arteriole from the LDX group (lisdexamfetamine dimesylate-treated group). Images were acquired at 40× magnification. (C) Analysis of left ventricular arteriole wall thickness. CT: control group; LDX: lisdexamfetamine dimesylate-treated group. Unpaired t-test.

3.7 LDX increases fractal dimension in cardiomyocyte nuclei

The effects of LDX administration during puberty on cardiac nuclear organization were evaluated by fractal dimension analysis (Fig. 8). Cardiomyocyte nuclei from LDX-treated animals exhibited a significantly higher fractal dimension compared with the CT group (CT: 1.54 a.u. [1.42–1.61] vs. LDX: 1.97 a.u. [1.91–1.98]; $p = 0.0006$), indicating increased structural complexity of the nuclear architecture.

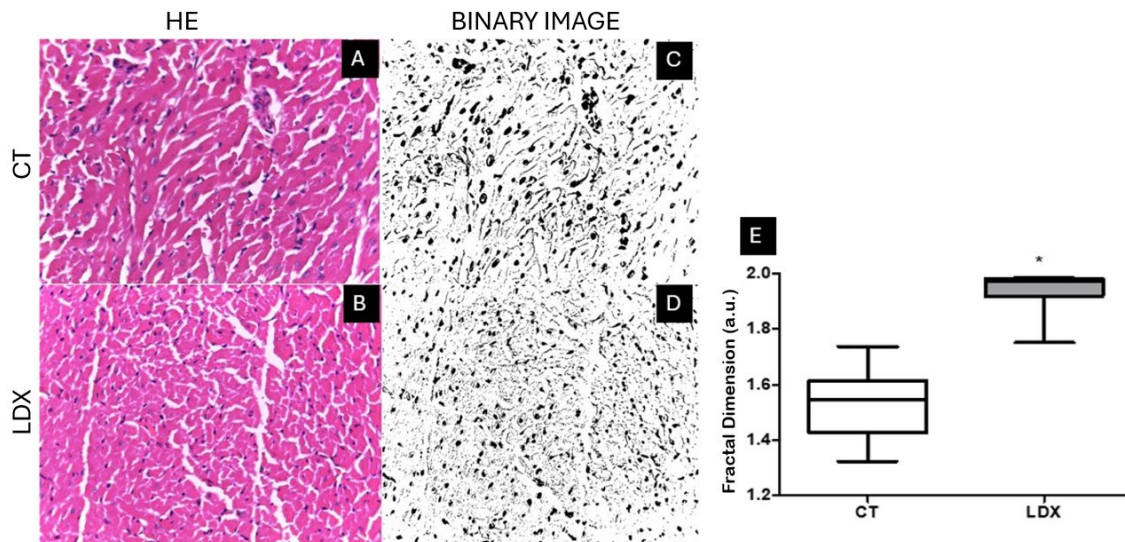


Figure 8. Fractal dimension analysis of cardiac nuclear structure. (A) Hematoxylin and eosin (HE)-stained section from the CT group. (B) HE-stained section from the LDX group (lisdexamfetamine dimesylate-treated group). (C) Binarized image of the CT group stained with HE. (D) Binarized image of the LDX group stained with HE. Images were acquired at 40× magnification. (E) Fractal dimension analysis. Mann–Whitney test, * $p = 0.0006$.

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that lisdexamfetamine dimesylate administration during the juvenile-pubertal period induced molecular and structural alterations in the left ventricle of Wistar rats. The main findings included reduced gene expression of the NADPH oxidase subunits NOX4, p22phox, and p47phox, absence of detectable changes in oxidative stress biomarkers, selective upregulation of p38-MAPK protein expression, increased cardiomyocyte nuclear fractal dimension, and extracellular matrix remodeling characterized by increased deposition of type I and type III collagens. Collectively, these findings suggest that LDX administration during a critical period of cardiac development is associated with modulation of redox-related signaling pathways and left ventricular remodeling.

The main molecular and structural alterations in the left ventricle induced by lisdexamfetamine dimesylate administration during the juvenile-pubertal are summarized in Figure 9.

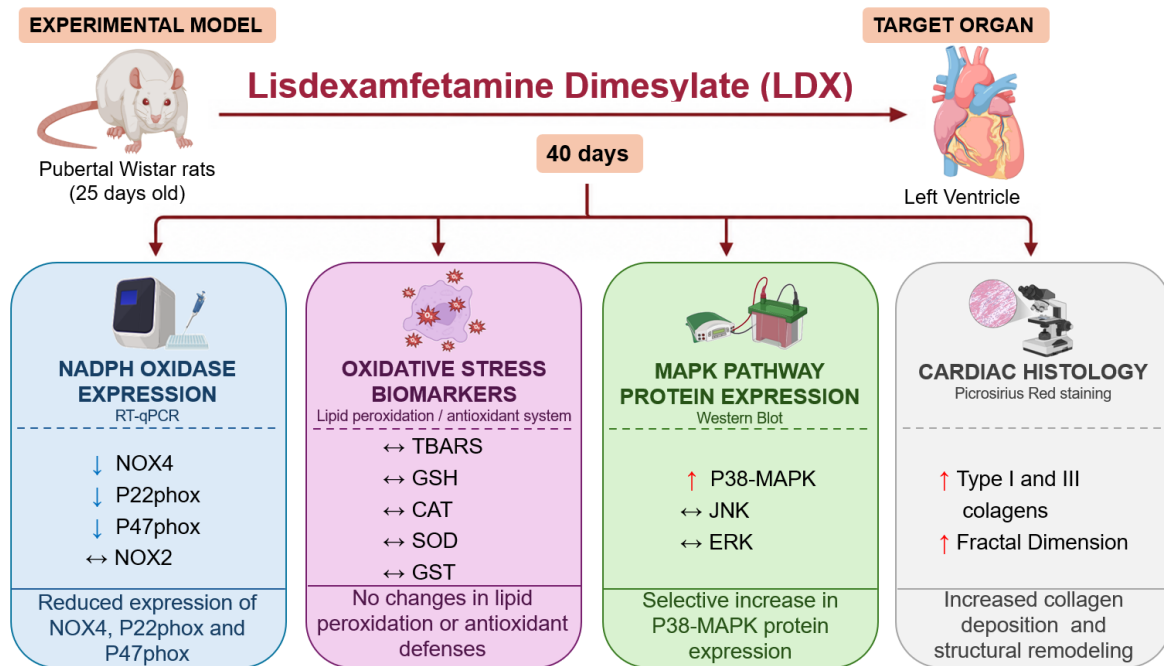


Figure 9. Proposed graphical summary of the effects of lisdexamfetamine dimesylate (LDX) administration during the juvenile-pubertal period on the left ventricle. Arrows indicate the direction of change relative to the control group (↑ increased, ↓ decreased, ↔ unchanged).

Our initial hypothesis proposed that LDX administration during puberty would induce oxidative stress-mediated cardiac remodeling, accompanied by activation of pro-hypertrophic MAPK signaling pathways and structural alterations in cardiomyocytes. However, the findings of the present study suggest a more complex biological response than originally anticipated. Although LDX administration reduced the expression of NADPH oxidase subunits involved in reactive oxygen species generation, no changes were observed in oxidative stress biomarkers, indicating preservation of myocardial redox homeostasis. Nevertheless, molecular and structural alterations were detected, including increased p38-MAPK expression, extracellular matrix remodeling, and changes in

cardiomyocyte nuclear organization. Together, these findings suggest that LDX-induced cardiac remodeling during puberty may occur in the absence of detectable oxidative stress, involving mechanisms associated with the modulation of redox signaling rather than oxidative damage per se.

One of the main findings of the present study was the significant downregulation of the NADPH oxidase subunits NOX4, p22phox, and p47phox in the left ventricle of LDX-treated animals. NADPH oxidase is considered a major source of reactive oxygen species (ROS) in the myocardium and plays a pivotal role in the regulation of cardiac redox signaling and myocardial remodeling [48,49]. Among the NADPH oxidase isoforms, NOX4 is highly expressed in cardiomyocytes and is predominantly localized to perinuclear compartments and the nuclear membrane, where it plays an important role in the maintenance of intracellular redox homeostasis [50]. Previous evidence has shown that modulation of NOX4 activity influences myocardial adaptation to cardiac stress, underscoring its role in the maintenance of redox homeostasis under pathological conditions [48–50].

In the present study, the downregulation of NOX4 was accompanied by reduced expression of p22phox and p47phox, suggesting coordinated regulation of NADPH oxidase complex components. Supporting this interpretation, previous studies have shown that cardiac-specific deletion of NOX4 leads to decreased p22phox expression, indicating a functional interaction between these subunits [50]. In contrast, experimental models involving cocaine administration have been shown to induce marked oxidative stress in the heart through activation of NADPH oxidase, characterized by increased expression of NOX2 and regulatory subunits including p22phox and p47phox, as well as enhanced ROS production and downstream MAPK signaling, contributing to cardiomyocyte injury [51]. Similarly, experimental models in brain endothelial cells have demonstrated that methamphetamine induces NADPH oxidase activation through phosphorylation of the p47phox subunit and assembly of an active NOX complex, leading to increased ROS production and endothelial dysfunction [52]. Together, these findings suggest that NADPH oxidase components are dynamically regulated in response to distinct types of stress across different tissues, although the direction and specific subunit

involvement may vary depending on the stimulus and cellular context. In addition, we observed reduced expression of p47phox, a cytosolic subunit that is essential for the assembly and activation of the NADPH oxidase complex, particularly the NOX2 isoform [53]. Although NOX2 expression remained unaltered, the reduction in p47phox suggests impaired activation of the NADPH oxidase complex and, consequently, a lower capacity for ROS generation. The maintenance of NOX2 expression, however, may indicate differential regulation of NADPH oxidase isoforms following LDX administration, given that NOX2 is more closely linked to inflammatory signaling and immune cell activation than to basal ROS production in cardiomyocytes [54]. Together, the coordinated downregulation of NOX4, p22phox, and p47phox suggests that LDX administration elicits adaptive responses aimed at modulating redox signaling and preserving cellular homeostasis.

Despite the alterations observed in NADPH oxidase components, LDX administration during puberty did not affect lipid peroxidation markers or antioxidant system parameters in the left ventricle. This pattern suggests that the downregulation of NADPH oxidase subunits may represent a regulatory response aimed at limiting excessive ROS production and preserving cardiac redox homeostasis. Accordingly, the molecular and structural changes identified in the myocardium were not accompanied by biochemical evidence of oxidative damage, indicating that LDX induced cardiac remodeling occurred in the absence of detectable alterations in oxidative stress biomarkers.

The preservation of redox homeostasis observed in the present study is in agreement with previous evidence obtained with d-amphetamine in Wistar rats, in which repeated administration of the drug (20 mg/kg/day for 14 days) did not significantly affect lipid peroxidation markers or components of the cardiac antioxidant system, despite the occurrence of oxidative alterations in other organs [55]. Notably, cardiac cysteine levels, the main precursor of GSH, were decreased without concomitant changes in antioxidant enzymes. Furthermore, acute d-amphetamine administration increased monoamine oxidase-dependent hydrogen peroxide production, highlighting the potential of catecholamines to modulate oxidative processes [55].

In contrast, alterations in oxidative stress biomarkers have been reported in other tissues following administration of amphetamines and their derivatives. In the kidneys of peripubertal rats exposed to LDX, increased leukocyte infiltration was associated with activation of antioxidant defenses, including increased CAT and GST activities and reduced GSH levels, in the absence of lipid peroxidation [56]. Similarly, Okamura et al. [57] demonstrated that three weeks of LDX administration induced redox imbalance in the central nervous system of Wistar rats, characterized by decreased GSH levels and increased TBARS concentrations. Collectively, these findings suggest that the redox effects of LDX are tissue-specific and may depend on both the duration of exposure and the local adaptive capacity of each tissue.

The absence of changes in oxidative stress biomarkers observed in the present study suggests that, under the experimental conditions evaluated, LDX administration was not associated with detectable alterations in lipid peroxidation or cardiac antioxidant defenses. However, the stability of MDA levels does not exclude the possibility of oxidative modifications affecting other molecular targets. Therefore, future studies incorporating markers of protein oxidation and DNA damage may provide a more comprehensive understanding of the mechanisms through which LDX modulates the cardiac redox environment.

Although no changes were observed in oxidative stress biomarkers, ROS exert functions that extend beyond the induction of cellular damage, acting as important signaling molecules in several physiological and pathological processes within the cardiovascular system [58,59]. NADPH oxidase-derived ROS participate in the regulation of intracellular pathways involved in cell growth, hypertrophy, myocardial remodeling, and stress responses, and are recognized as key mediators of cardiac redox signaling [58–60]. Among the signaling pathways regulated by redox-dependent mechanisms, the MAPK family has received considerable attention, as its activity can be modulated by changes in ROS production [58,59]. In this context, the reduced expression of NADPH oxidase components observed in the present study, together with the selective increase in p38-MAPK protein expression, suggests that LDX administration modulates redox-

sensitive signaling pathways involved in cardiac remodeling, even in the absence of detectable changes in classical oxidative stress biomarkers.

In the present study, LDX administration during the juvenile–pubertal period selectively increased p38 MAPK protein expression in the left ventricle, whereas ERK and JNK expression remained unchanged. These findings suggest that LDX did not induce a generalized modulation of MAPK signaling pathways, but rather a specific effect on the p38 MAPK pathway. Given the established role of p38 MAPK in cardiac remodeling and stress-related cellular responses [61–65], its increased expression may be associated with the structural alterations observed in the present study, including enhanced collagen type I and III deposition and changes in cardiomyocyte nuclear organization.

In contrast, ERK and JNK expression remained unaltered, indicating that the cardiac effects of juvenile–pubertal LDX administration were not accompanied by broad changes in MAPK family proteins. Since ERK is commonly associated with adaptive hypertrophic signaling and JNK with cellular stress responses [61,67], the absence of alterations in these isoforms further supports a selective modulation of p38 MAPK. Notably, this increase occurred in parallel with extracellular matrix remodeling and alterations in cardiomyocyte nuclear architecture, suggesting a potential involvement of p38 MAPK in the myocardial remodeling induced by LDX administration.

From a structural perspective, LDX administration during puberty induced alterations in cellular organization and extracellular matrix composition in the left ventricle. Although no changes were observed in cardiomyocyte cross-sectional area, arteriolar wall thickness, or total interstitial collagen fraction, an increase in cardiomyocyte nuclear fractal dimension and enhanced deposition of type I and III collagen were detected. These findings support the molecular results discussed above, suggesting that LDX administration was able to trigger cardiac remodeling processes even in the absence of classical morphological changes, such as cellular hypertrophy or increased total collagen deposition.

Fractal analysis has been widely used to quantify changes in the complexity and structural organization of cardiac tissue and is considered a sensitive tool for

detecting alterations associated with myocardial remodeling [47]. Experimental studies have shown that changes in cardiomyocyte and nuclear fractal dimension may reflect structural reorganization related to cellular adaptation to different physiological and pathological stimuli, including ventricular remodeling and cardiac dysfunction [45]. Alterations in nuclear morphology and organization have been associated with the modulation of transcriptional activity and cellular responses to diverse stimuli, potentially reflecting adaptive processes involved in cardiac remodeling [64,65,68]. Thus, the increase in nuclear fractal dimension observed in the present study suggests alterations in the organization of cardiomyocyte nuclear architecture, possibly related to changes in the signaling pathways described herein, including modulation of NADPH oxidase components and increased p38 MAPK expression. The absence of an increase in cardiomyocyte cross-sectional area indicates that these changes occurred independently of detectable cellular hypertrophy, suggesting that nuclear architectural modifications may represent early events in myocardial remodeling. However, as functional assessments such as echocardiography were not performed, it was not possible to determine whether these structural changes are associated with functional cardiac impairment.

In addition to nuclear alterations, we observed a selective increase in type I and III collagen without changes in total interstitial collagen content. Type I and III collagens are the main components of the cardiac extracellular matrix and play a fundamental role in myocardial structural support and mechanical properties [69]. Changes in the proportion or deposition of these isoforms may alter extracellular matrix organization, thereby influencing tissue stiffness, elasticity, and structural integrity. Clinical and experimental studies have shown that type I and III collagens actively participate in myocardial remodeling processes observed in different pathological conditions, including cardiac hypertrophy, heart failure, and post-infarction fibrosis [70]. Considering that lisdexamfetamine is an amphetamine-derived psychostimulant that enhances catecholaminergic neurotransmission, our findings are consistent with previous experimental evidence demonstrating that amphetamine derivatives induce structural and histopathological changes in cardiac tissue. In rats, methamphetamine self-administration has been associated

with increased collagen deposition, interstitial and perivascular fibrosis, cardiomyocyte hypertrophy, and increased cardiac mass [71]. Similar profibrotic responses have also been reported in zebrafish exposed to methamphetamine, demonstrating increased collagen accumulation in cardiac tissue [72]. Although we did not observe changes in total collagen content, the selective increase in type I and III collagen expression suggests a reorganization of extracellular matrix composition in the left ventricle. Together with the nuclear alterations observed in cardiomyocytes, these findings suggest that pubertal LDX administration may induce early cardiac remodeling.

The structural findings observed, together with alterations in redox signaling–related pathways and p38 MAPK activation, support the hypothesis that LDX administration during puberty triggers molecular and cellular responses associated with cardiac remodeling. These findings suggest that modulation of pathways involved in redox signaling and cellular stress responses may contribute to changes in cardiomyocyte organization and extracellular matrix composition in the left ventricle. Considering that puberty represents a period of intense cardiovascular maturation, such adaptations may influence myocardial development and potentially impact susceptibility to cardiovascular alterations in later stages of life.

Among the main strengths of this study is the integrated approach used to investigate the cardiac effects of juvenile-pubertal LDX administration, combining molecular, biochemical, and histological analyses. This strategy enabled a comprehensive characterization of the responses induced by treatment, ranging from modulation of redox signaling–related pathways and myocardial remodeling to changes in cellular organization and extracellular matrix composition. In addition, the experimental period is translationally relevant, as puberty in rats corresponds to a phase of intense cardiovascular maturation that is, in several physiological aspects, comparable to human adolescence [73]. Considering that LDX is widely used in the treatment of ADHD in children and adolescents, the present findings contribute to expanding current knowledge regarding the potential cardiovascular effects of exposure to this drug during a critical window of cardiac development.

Some limitations should be considered when interpreting the present findings. The absence of functional assessments, such as echocardiography, precluded the evaluation of potential functional consequences of the observed molecular and structural alterations. In addition, the study was conducted exclusively in male animals, limiting the extrapolation of the results to females, particularly given well-established sex differences in cardiovascular physiology and in responses to cardiac remodeling. Another limitation is the restricted administration period of LDX, limited to the pubertal phase, which prevents assessment of the persistence of these alterations after treatment discontinuation or their potential progression into adulthood. Likewise, the use of a single drug dose did not allow the investigation of dose–response relationships. Considering that exposures occurring during critical developmental windows may manifest later in life, as proposed by the DOHaD concept, future studies should include both sexes, multiple dosing regimens, extended follow-up periods, and comprehensive cardiac functional evaluations to more fully elucidate the cardiovascular impacts of LDX across development.

The results of the present study indicate that juvenile-pubertal LDX administration was able to trigger molecular and structural responses consistent with cardiac remodeling, even in the absence of detectable biochemical evidence of oxidative stress. These findings suggest the involvement of mechanisms related to redox signaling modulation and pathways associated with myocardial remodeling during a critical phase of cardiovascular development.

Considering that puberty and adolescence represent important windows of biological plasticity, these results are relevant in light of the DOHaD concept. Recent evidence indicates that environmental, nutritional, and pharmacological exposures during this period may influence the trajectory of cardiovascular development and the susceptibility to cardiometabolic diseases in adulthood [23]. In this context, the alterations observed in the left ventricle suggest that juvenile-pubertal LDX administration may interfere with mechanisms involved in cardiovascular programming, reinforcing the need for longitudinal studies to clarify its potential long-term consequences.

CONCLUSION

Juvenile-pubertal to lisdexamfetamine dimesylate administration induced molecular and structural alterations in the left ventricle of Wistar rats, including reduced expression of NADPH oxidase subunits, increased p38 MAPK expression, extracellular matrix remodeling with enhanced deposition of type I and III collagen, and changes in cardiomyocyte nuclear organization. Despite these modifications, oxidative stress biomarkers remained unaltered, suggesting that the observed cardiac remodeling is associated with modulation of redox signaling pathways rather than detectable oxidative damage. In light of the DOHaD concept, these findings indicate that juvenile-pubertal LDX administration during a critical window of cardiovascular development may influence mechanisms involved in cardiac programming and potentially contribute to increased susceptibility to cardiovascular alterations later in life.

CRedit authorship contribution statement

Alessandra Straioto Salomão: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Formal analysis, Visualization, Writing – original draft. **Ana Carolina Biscola Catucci:** Investigation, Data curation, Formal analysis. **Gisele Correia da Silva:** Investigation, Data curation, Formal analysis. **Camila Fernandes de Oliveira:** Investigation, Data curation, Formal analysis. **Anna Clara Consorti dos Santos:** Investigation, Data curation, Formal analysis. **Carolina Rodrigues Tonon:** Investigation, Formal analysis. **Luana Urbano Pagan:** Investigation, Formal analysis. **Giovanna Fachetti Frigoli:** Investigation, Formal analysis. **João Vinícius Honório da Silva:** Investigation, Formal analysis. **Glaura Scantamburlo Alves Fernandes:** Resources, Investigation, Formal analysis. **Marina Politi Okoshi:** Resources, Supervision Methodology, Resources, Supervision, Writing – review & editing. **Francis Lopes Pacagnelli:** Conceptualization, Supervision, Project administration, Writing – review & editing.

Funding sources

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

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

7. REFERENCES

- [1] J.E. Frampton, Lisdexamfetamine Dimesylate: A Review in Paediatric ADHD, *Drugs* 78 (2018) 1025–1036. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0936-0>.
- [2] P.H. Hutson, M. Pennick, R. Secker, Preclinical pharmacokinetics, pharmacology and toxicology of lisdexamfetamine: a novel d-amphetamine pro-drug, *Neuropharmacology* 87 (2014) 41–50. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2014.02.014>.
- [3] M.L. Wolraich, J.F. Hagan, C. Allan, E. Chan, D. Davison, M. Earls, S.W. Evans, S.K. Flinn, T. Froehlich, J. Frost, J.R. Holbrook, C.U. Lehmann, H.R. Lessin, K. Okechukwu, K.L. Pierce, J.D. Winner, W. Zurhellen, Clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents, *Pediatrics* 144 (2019). <https://doi.org/10.1542/peds.2019-2528>.
- [4] L. Hennissen, M.J. Bakker, T. Banaschewski, S. Carucci, D. Coghill, M. Danckaerts, R.W. Dittmann, C. Hollis, H. Kovshoff, S. McCarthy, P. Nagy, E. Sonuga-Barke, I.C.K. Wong, A. Zuddas, E. Rosenthal, J.K. Buitelaar, Cardiovascular Effects of Stimulant and Non-Stimulant Medication for Children and Adolescents with ADHD: A Systematic Review and Meta-Analysis of Trials of Methylphenidate, Amphetamines and Atomoxetine, *CNS Drugs* 31 (2017) 199–215. <https://doi.org/10.1007/S40263-017-0410-7>.
- [5] T.B. Fay, M.A. Alpert, Cardiovascular Effects of Drugs Used to Treat Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Part 2: Impact on Cardiovascular Events and Recommendations for Evaluation and Monitoring, *Cardiology in Review* 27 (2019) 173–178. <https://doi.org/10.1097/CRD.0000000000000234>.
- [6] J.W. Yester, B. Kühn, Mechanisms of Cardiomyocyte Proliferation and Differentiation in Development and Regeneration, *Current Cardiology Reports* 19 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11886-017-0826-1>.
- [7] A.N.D.S. Govette, Alexa, No Title A growing advantage: are cardiovascular adaptations to endurance training in children enhanced following the onset of

- puberty?, *The Journal of Physiology* 10 (2022) 2279–2281.
<https://doi.org/doi.org/10.1113/JP283031>.
- [8] N.T. Lam, H.A. Sadek, Neonatal heart regeneration comprehensive literature review, *Circulation* 138 (2018) 421–423.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033648>.
- [9] H.A. Sadek, E.R. Porrello, Neonatal heart regeneration: Moving from phenomenology to regenerative medicine, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 159 (2020) 2451–2455.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2019.11.140>.
- [10] S. Yi, L. Ren, T. Yang, L. Liu, H. Wang, Q. Liu, Myocardial lesions after long-term administration of methamphetamine in rats, *Chinese Medical Sciences Journal* 23 (2008) 239–243. [https://doi.org/10.1016/S1001-9294\(09\)60046-8](https://doi.org/10.1016/S1001-9294(09)60046-8).
- [11] K.C. Lord, S.K. Shenouda, E. McIlwain, D. Charalampidis, P.A. Lucchesi, K.J. Varner, Oxidative stress contributes to methamphetamine-induced left ventricular dysfunction, *Cardiovascular Research* 87 (2010) 111–118.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvq043>.
- [12] D.B. Vaupel, C.W. Schindler, S. Chefer, A.M. Belcher, I. Ahmet, K.B. Scheidweiler, M.A. Huestis, E.A. Stein, Delayed emergence of methamphetamine's enhanced cardiovascular effects in nonhuman primates during protracted methamphetamine abstinence, *Drug and Alcohol Dependence* 159 (2016) 181–189.
<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.12.008>.
- [13] M. Jafari Giv, Exposure to Amphetamines Leads to Development of Amphetamine Type Stimulants Associated Cardiomyopathy (ATSAC), *Cardiovascular Toxicology* 17 (2017) 13–24. <https://doi.org/10.1007/s12012-016-9385-8>.
- [14] C. Zuppinger, F. Timolati, T.M. Suter, Pathophysiology and diagnosis of cancer drug induced cardiomyopathy, *Cardiovascular Toxicology* 7 (2007) 61–66. <https://doi.org/10.1007/s12012-007-0016-2>.
- [15] C.J.A. Ramachandra, S. Cong, X. Chan, E.P. Yap, F. Yu, D.J. Hausenloy, Oxidative stress in cardiac hypertrophy: From molecular mechanisms to novel

- therapeutic targets, *Free Radical Biology and Medicine* 166 (2021) 297–312. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.02.040>.
- [16] Y. Chen, Z. Ge, S. Huang, L. Zhou, C. Zhai, Y. Chen, Q. Hu, W. Cao, Y. Weng, Y. Li, Delphinidin attenuates pathological cardiac hypertrophy via the AMPK/NOX/MAPK signaling pathway, *Aging* 12 (2020) 5362–5383. <https://doi.org/10.18632/aging.102956>.
- [17] K.T. Weber, Y. Sun, S.C. Tyagi, J.P.M. Cleutjens, Collagen Network of the Myocardium: Function, Structural Remodeling and Regulatory Mechanisms, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 26 (1994) 279–292. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1994.1036>.
- [18] N.G. Frangogiannis, The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling, *J Clin Invest* 127 (2017) 1600–1612. <https://doi.org/10.1172/JCI87491>.
- [19] L.Y. Tanaka, F.R.M. Laurindo, Vascular remodeling: A redox-modulated mechanism of vessel caliber regulation, *Free Radical Biology and Medicine* 109 (2017) 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.025>.
- [20] K. Sonoyama, A. Greenstein, A. Price, K. Khavandi, T. Heagerty, Review: Vascular remodeling: implications for small artery function and target organ damage, *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* 1 (2007) 129–137. <https://doi.org/10.1177/1753944707086358>.
- [21] E. Karbassi, M. Rosa-Garrido, D.J. Chapski, Y. Wu, S. Ren, Y. Wang, E. Stefani, T.M. Vondriska, Direct visualization of cardiac transcription factories reveals regulatory principles of nuclear architecture during pathological remodeling, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 128 (2019) 198–211. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.02.003>.
- [22] S. Li, R. Li, C. Liu, D. Xu, L. Han, Nuclear Lamins in Cardiac Development and Disease, *Cells* 15 (2026) 844. <https://doi.org/10.3390/cells15090844>.
- [23] B. Carducci, Z.H. Chen, S.C. Campisi, K. Miliku, Adolescence as a key developmental window for nutrition promotion and cardiometabolic disease prevention, *NPJ Metab Health Dis* 3 (2025) 40. <https://doi.org/10.1038/s44324-025-00082-1>.

- [24] J.D. Clark, G.F. Gebhart, J.C. Gonder, M.E. Keeling, D.F. Kohn, Special Report: The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, *ILAR Journal* 38 (1997) 41–48. <https://doi.org/10.1093/ILAR.38.1.41>.
- [25] N.P. du Sert, V. Hurst, A. Ahluwalia, S. Alam, M.T. Avey, M. Baker, W.J. Browne, A. Clark, I.C. Cuthill, U. Dirnagl, M. Emerson, P. Garner, S.T. Holgate, D.W. Howells, N.A. Karp, S.E. Lazic, K. Lidster, C.J. MacCallum, M. Macleod, E.J. Pearl, O.H. Petersen, F. Rawle, P. Reynolds, K. Rooney, E.S. Sena, S.D. Silberberg, T. Steckler, H. Würbel, The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research, *PLOS Biology* 18 (2020) e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>.
- [26] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, Food and Drug Administration..Rockville, EUA (2005).
- [27] S. Krishnan, S. Montcrief, Toxicity profile of lisdexamfetamine dimesylate in three independent rat toxicology studies, *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 101 (2007) 231–240. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00093.x>.
- [28] E.J. Clegg, The age at which male rats become fertile, *Journal of Reproduction and Fertility* Vol.1 (1960) pp.119-120.
- [29] S.R. ;ANDREWS W.W.; A.J.P.; S.W.S. OJEDA, Recent advances in the endocrinology of puberty, *Endocr Rev* 3 (1980) 228–57.
- [30] A.R.R. Lima, P.F. Martinez, R.L. Damatto, M.D.M. Cezar, D.M. Guizoni, C. Bonomo, S.A. Oliveira, M. Dal-Pai Silva, L.A.M. Zornoff, K. Okoshi, M.P. Okoshi, Heart failure-induced diaphragm myopathy, *Cellular Physiology and Biochemistry* 34 (2014) 333–345. <https://doi.org/10.1159/000363003>.
- [31] P.F. Martinez, K. Okoshi, L.A.M. Zornoff, R.F. Carvalho, S.A. Oliveira, A.R.R. Lima, D.H.S. Campos, R.L. Damatto, C.R. Padovani, C.R. Nogueira, M.D. Pai-Silva, M.P. Okoshi, Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and changes in myogenic regulatory factors, *Medical Science Monitor* 16 (2010) 374–383.

- [32] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [33] O.V. Lushchak, O.I. Kubrak, O.V. Lozinsky, J.M. Storey, K.B. Storey, V.I. Lushchak, Chromium(III) induces oxidative stress in goldfish liver and kidney, *Aquatic Toxicology* 93 (2009) 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.03.007>.
- [34] J.A. Buege, S.D. Aust, Microsomal Lipid Peroxidation, *Methods in Enzymology* 52 (1978) 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
- [35] I. Rahman, A. Kode, S.K. Biswas, Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method, *Nature Protocols* 1 (2007) 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>.
- [36] [13] Catalase in vitro, in: *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1984: pp. 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- [37] M. Senthilkumar, N. Amaresan, A. Sankaranarayanan, *Plant-Microbe Interactions: Laboratory Techniques*, Springer US, New York, NY, 2021. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0>.
- [38] J.H. Keen, W.H. Habig, W.B. Jakoby, Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases., *Journal of Biological Chemistry* 251 (1976) 6183–6188. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0).
- [39] A.L.R. Negrão, B. de Oliveira, M. de G. Gonçalves, T.B. Mariano, T.F. da S. Oliveira, A.K.D.A. Sabela, R.C.R. e Silva, R. de O. Mantovani, G.A. Nai, F.L. Pacagnelli, Effect of Short-Term Inhalation of The Herbicide 2,4D on Cardiac Remodeling: Morphological Aspects, *Int. J. Cardiovasc. Sci.* 32 (2019) 247–252. <https://doi.org/https://doi.org/10.5935/2359-4802.20190014>.
- [40] S.A. Oliveira Junior, C.R. Padovani, S.A. Rodrigues, N.R. Silva, P.F. Martinez, D.H. Campos, M.P. Okoshi, K. Okoshi, M. Dal-Pai, A.C. Cicogna, Extensive impact of saturated fatty acids on metabolic and cardiovascular profile in rats

- with diet-induced obesity: a canonical analysis, *Cardiovasc Diabetol* 12 (2013) 65. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-65>.
- [41] L.S. Matsubara, B.B. Matsubara, M.P. Okoshi, A.C. Cicogna, J.S. Janicki, Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279 (2000) H1534-1539. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.4.H1534>.
- [42] E. Huet, E. Huet, E. Gabison, B. Vallee, N. Mougenot, G. Linguet, B. Riou, C. Jarosz, S. Menashi, S. Besse, Deletion of extracellular matrix metalloproteinase inducer/cd147 induces altered cardiac extracellular matrix remodeling in aging mice, *J. Physiol. Pharmacol.* 66 (2015) 355–366.
- [43] T.A. Garcia, G.A.T. Ozaki, R.C. Castoldi, A.E. Job, R.C.T. Camargo, J.C.S.C. Filho, W.D. Belangero, Collagen I and III ratios and tenacity of rats' muscle injured and treated with platelet-rich plasma, *International Journal of Morphology* 38 (2020) 1392–1397. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022020000501392>.
- [44] J. Michalany, Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico, São Paulo, 1981.
- [45] F.L. Pacagnelli, A.K.D. de A. Sabela, T.B. Mariano, G.A.T. Ozaki, R.C. Castoldi, E.M. do Carmo, R.F. Carvalho, L.C. Tomasi, K. Okoshi, L.C.M. Vanderlei, Fractal Dimension in Quantifying Experimental-Pulmonary-Hypertension-Induced Cardiac Dysfunction in Rats, *Arq Bras Cardiol* 107 (2016) 33–39. <https://doi.org/10.5935/abc.20160083>.
- [46] S.S. Cury, P.P. Freire, B. Martinucci, V.C. dos Santos, G. de Oliveira, R. Ferretti, M. Dal-Pai-Silva, F.L. Pacagnelli, F.K. Delella, R.F. Carvalho, Fractal dimension analysis reveals skeletal muscle disorganization in mdx mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 503 (2018) 109–115. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.05.189>.
- [47] P.F. Fávero, V.A. Vieira de Lima, P. Helena dos Santos, A.P. Marques Andrade, L.O. Mendes, F.L. Pacagnelli, A. César de Souza Castilho, Differential fractal dimension is associated with extracellular matrix remodeling in developing bovine corpus luteum, *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications 516 (2019) 888–893.
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2019.06.002>.
- [48] K. Bedard, K.-H. Krause, The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology, *Physiological Reviews* 87 (2007) 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>.
- [49] G.R. Drummond, C.G. Sobey, Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease?, *Trends in Endocrinology & Metabolism* 25 (2014) 452–463. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.06.012>.
- [50] S. Matsushima, J. Kuroda, T. Ago, P. Zhai, J.Y. Park, L.-H. Xie, B. Tian, J. Sadoshima, Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy, *Circ Res* 112 (2013) 651–663. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.279760>.
- [51] L. Fan, D. Sawbridge, V. George, L. Teng, A. Bailey, I. Kitchen, J.-M. Li, Chronic Cocaine-Induced Cardiac Oxidative Stress and Mitogen-Activated Protein Kinase Activation: The Role of Nox2 Oxidase, *J Pharmacol Exp Ther* 328 (2009) 99–106. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.145201>.
- [52] M. Park, B. Hennig, M. Toborek, Methamphetamine alters occludin expression via NADPH oxidase-induced oxidative insult and intact caveolae, *J Cell Mol Med* 16 (2012) 362–375. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01320.x>.
- [53] G.R. Drummond, S. Selemidis, K.K. Griendling, C.G. Sobey, Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets, *Nat Rev Drug Discov* 10 (2011) 453–471. <https://doi.org/10.1038/nrd3403>.
- [54] B. Lassègue, A. San Martín, K.K. Griendling, Biochemistry, Physiology and Pathophysiology of NADPH Oxidases in the Cardiovascular System, *Circ Res* 110 (2012) 1364–1390. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.243972>.
- [55] F. Carvalho, E. Fernandes, F. Remião, M.L. Bastos, Effect of d-amphetamine repeated administration on rat antioxidant defences, *Arch Toxicol* 73 (1999) 83–89. <https://doi.org/10.1007/s002040050591>.
- [56] J.V. Honório da Silva, R.P. Erthal, I.C. Vercellone, D.P. dos Santos, C.R. Ferraz, R.L.N. de Matos, L.E.D. Gonçalves, A.P.F.R.L. Bracarense, W.A. Verri Jr., N.O.S. Câmara, F.G. de Andrade, G.S.A. Fernandes, Lisdexamfetamine

- dimesylate-exposition in male rats during the peripubertal period impairs inflammatory mechanisms, antioxidant activity, and apoptosis process in kidneys of male pubertal rats, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 38 (2024) e23781. <https://doi.org/10.1002/jbt.23781>.
- [57] A.M.N.C. Okamura, Análise comportamental e neuroquímica de ratos tratados com doses repetidas de lisdexanfetamina na infância e periadolescência, (2019). <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/41471> (accessed June 29, 2025).
- [58] C.E. Murdoch, M. Zhang, A.C. Cave, A.M. Shah, NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure, *Cardiovascular Research* 71 (2006) 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.03.016>.
- [59] A. Akki, M. Zhang, C. Murdoch, A. Brewer, A.M. Shah, NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47 (2009) 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.04.004>.
- [60] A. Nabeebaccus, M. Zhang, A.M. Shah, NADPH oxidases and cardiac remodelling, *Heart Fail Rev* 16 (2011) 5–12. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9186-2>.
- [61] S. Haq, G. Choukroun, H. Lim, K.M. Tymitz, F. del Monte, J. Gwathmey, L. Grazette, A. Michael, R. Hajjar, T. Force, J.D. Molkentin, Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure, *Circulation* 103 (2001) 670–677. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.5.670>.
- [62] Q. Chen, Y. Li, B. Bie, B. Zhao, Y. Zhang, S. Fang, S. Li, Y. Zhang, P38 MAPK activated ADAM17 mediates ACE2 shedding and promotes cardiac remodeling and heart failure after myocardial infarction, *Cell Communication and Signaling* 21 (2023) 73. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01087-3>.
- [63] H. Kan, D. Birkle, A.C. Jain, C. Failing, S. Xie, M.S. Finkel, p38 MAP kinase inhibitor reverses stress-induced cardiac myocyte dysfunction, *Journal of Applied Physiology* 98 (2005) 77–82. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00171.2004>.

- [64] T.J. Kirby, J. Lammerding, Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor, *Nat Cell Biol* 20 (2018) 373–381.
<https://doi.org/10.1038/s41556-018-0038-y>.
- [65] S. Cho, J. Irianto, D.E. Discher, Mechanosensing by the nucleus: From pathways to scaling relationships, *J Cell Biol* 216 (2017) 305–315.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201610042>.
- [66] Á. Gutiérrez-Uzquiza, M. Arechederra, P. Bragado, J.A. Aguirre-Ghiso, A. Porras, p38 α Mediates Cell Survival in Response to Oxidative Stress via Induction of Antioxidant Genes, *J Biol Chem* 287 (2012) 2632–2642.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323709>.
- [67] W. Zhang, V. Elimban, M.S. Nijjar, S.K. Gupta, N.S. Dhalla, Role of mitogen-activated protein kinase in cardiac hypertrophy and heart failure, *Exp Clin Cardiol* 8 (2003) 173–183.
- [68] A. Bertero, M. Rosa-Garrido, Three-dimensional chromatin organization in cardiac development and disease, *J Mol Cell Cardiol* 151 (2021) 89–105.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.11.008>.
- [69] J.E. Bishop, G.J. Laurent, Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart, *European Heart Journal* 16 (1995) 38–44.
https://doi.org/10.1093/eurheartj/16.suppl_C.38.
- [70] M. Ortega, M.M. Fábrega-García, T. Molina-García, J. Gavara, E. de Dios, N. Pérez-Solé, V. Marcos-Garcés, J.J. Padilla-Esquivel, A. Diaz, L. Martinez-Dolz, M. Jimenez-Navarro, C. Rios-Navarro, V. Bodí, A. Ruiz-Saurí, Novel Fibrillar and Non-Fibrillar Collagens Involved in Fibrotic Scar Formation after Myocardial Infarction, *Int J Mol Sci* 25 (2024) 6625.
<https://doi.org/10.3390/ijms25126625>.
- [71] C.S. Abdullah, N.S. Remex, R. Aishwarya, S. Nitu, G.K. Kolluru, J. Traylor, B. Hartman, J. King, M.A.N. Bhuiyan, N. Hall, K.S. Murnane, N.E. Goeders, C.G. Kevil, A.W. Orr, Md.S. Bhuiyan, Mitochondrial dysfunction and autophagy activation are associated with cardiomyopathy developed by extended methamphetamine self-administration in rats, *Redox Biol* 58 (2022) 102523.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102523>.

- [72] J. Zhang, A.H. Nguyen, D. Jilani, R.S. Trigo Torres, L. Schmiess-Heine, T. Le, X. Xia, H. Cao, Consecutive treatments of methamphetamine promote the development of cardiac pathological symptoms in zebrafish, *PLoS One* 18 (2023) e0294322. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294322>.
- [73] D. Wulfsohn, J.R. Nyengaard, Y. Tang, Postnatal growth of cardiomyocytes in the left ventricle of the rat, *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 277 (2004) 236–247. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20009>.

ARTIGO 2

Leishmaniose visceral no Brasil: análise temporal e espacial da mortalidade 2015-2024

Karen Galvão Valeriano¹, Alessandra Straioto Salomão², Mariana Esperendi Bastinini Lario³, Ana Paula Alves Favareto⁴, Renata Calciolari Rossi Silva⁴, Francis Lopes Pacagnelli^{1,2}

¹ Faculdade de Ciências da Saúde, Curso de Fisioterapia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

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

³ Faculdade de Odontologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional (PPGMADRE), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

Autor correspondente:

Karen Galvão Valeriano

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Rua José Bongiovani, 700

Presidente Prudente, SP, CEP 19050-680, Brasil

E-mail: karengalvaovaleriano@hotmail.com

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: Epidemiologia e Serviços de Saúde, percentil de 74% na Scopus.

ARTIGO 2

Leishmaniose visceral no Brasil: análise temporal e espacial da mortalidade 2015-2024

Resumo

Objetivo: Analisar os padrões espaciais e distribuição temporal da mortalidade por leishmaniose visceral no Brasil (2015-2024). **Métodos:** Estudo descritivo e analítico de série temporal, com análise espacial, baseado em dados do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM/DATASUS). Foram incluídos todos os óbitos por leishmaniose visceral (CID-10: B55.0) no período, estratificados por sexo e faixa etária (1 a 19 anos, 20 a 59 anos e ≥ 60 anos) e agregados por municípios. A tendência temporal da mortalidade foi avaliada por regressão linear segmentada Joinpoint, representada pela Variação Percentual Anual (APC). A análise espacial incluiu estimador de densidade de Kernel, Índice Global de Moran, Indicadores Locais de Associação Espacial (LISA), estatística Getis-Ord G_i^* e análise bivariada entre internações e mortalidade. **Resultados:** Foram registrados 816 óbitos por leishmaniose visceral no Brasil entre 2015 e 2024. Observou-se redução constante e significativa da taxa de mortalidade no período ($APC = -10,66\%$; p-valor 0,04). Houve maior mortalidade no sexo masculino (65,2%) e na faixa etária de 20 a 59 anos (49,0%). Identificaram-se aglomerados persistentes de altas taxas nas regiões Norte e Nordeste, concentrando juntos mais de 80% dos óbitos registrados no período. Por outro lado, as regiões Sul e Sudeste apresentaram, juntas as menores proporções de óbitos, com 14,5% do total nacional. **Conclusão:** A mortalidade por leishmaniose visceral no Brasil apresentou redução significativa no período analisado, porém manteve padrões espaciais persistentes e desiguais em áreas historicamente vulneráveis, principalmente nos estados de Alagoas, Paraíba, Tocantins, Piauí, Maranhão e Pará.

Palavras-chave: Doenças negligenciadas, Sistemas de informação em saúde, Monitoramento epidemiológico, Análise espacial, Distribuição temporal.

Aspectos éticos
Estudo baseado em dados agregados de domínio público.

Introdução

A leishmaniose visceral é relevante problema de saúde pública em diferentes regiões ecoepidemiológicas do mundo, incluindo as Américas, a África Oriental e do Norte, e a Ásia Ocidental e Sudeste Asiático [1]. Na América Latina, o Brasil concentra a maior carga da doença, sendo responsável por 93,5% das notificações por leishmaniose visceral, o que evidencia a magnitude do desafio para a saúde pública nacional [2].

Trata-se de uma zoonose sistêmica grave, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por flebotomíneos infectados, tendo o cão doméstico como principal reservatório urbano [3,4]. O quadro clínico caracteriza-se por febre prolongada, perda ponderal, hepatoesplenomegalia e alterações hematológicas. Na ausência de diagnóstico e tratamento adequados, a doença pode evoluir para complicações graves e óbito [3,5].

Apesar da disponibilidade terapêutica, a letalidade permanece elevada no Brasil, associada ao diagnóstico tardio, à gravidade clínica e às desigualdades no acesso aos serviços de saúde. Esse cenário configura importante problema de saúde pública [6–8].

No Brasil, a leishmaniose visceral afeta predominantemente populações socioeconomicamente vulneráveis e concentra-se sobretudo nas regiões Norte e Nordeste [6,10]. A persistência da transmissão e a ocorrência de óbitos estão associadas a saneamento inadequado, precariedade habitacional, ocupação desordenada do espaço urbano, proximidade de remanescentes florestais, condições climáticas favoráveis ao vetor e limitações nas ações de controle [6,7]. Esse panorama epidemiológico alinha-se a evidências internacionais de países como Índia e Etiópia, onde o diagnóstico tardio e as comorbidades preexistentes aumentam a letalidade em populações de baixa renda [8,9,10]. Estudo recente observou redução na incidência de casos de leishmaniose visceral no Brasil entre 2007 e 2020 [10]. Porém, não há análises de distribuição linear da mortalidade em escala nacional recente. Os estudos disponíveis concentram-se em recortes regionais [16,17] ou em períodos mais antigos em âmbito nacional [18,20]. Essa lacuna restringe a compreensão da heterogeneidade territorial e da dinâmica temporal dos óbitos, dificultando a priorização de ações de vigilância, prevenção e cuidado no SUS, bem como o direcionamento eficiente de recursos públicos.

O presente estudo teve como objetivo analisar a distribuição temporal e espacial da mortalidade por leishmaniose visceral no Brasil, no período de 2015 a 2024, para identificar áreas de maior concentração de risco e padrões territoriais persistentes, subsidiando o planejamento de políticas públicas e o fortalecimento da vigilância epidemiológica.

Métodos

Delineamento

Trata-se de estudo analítico e descritivo de série temporal com análise da distribuição espacial da mortalidade por leishmaniose visceral no Brasil, utilizando dados secundários agregados por municípios no período de 2015 a 2024. O estudo seguiu as recomendações da diretriz STROBE Statement (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) para estudos observacionais [11].

Contexto

O estudo envolveu todos os municípios brasileiros, considerando o município de residência como unidade territorial de análise e o ano calendário como unidade de agregação temporal. A análise espaço-temporal da mortalidade foi utilizada para identificar padrões territoriais e áreas prioritárias para vigilância epidemiológica e planejamento de ações no âmbito do Sistema Único de Saúde.

Participantes

Foram incluídos todos os óbitos por leishmaniose visceral (CID-10: B55.0), registrados no Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), e a as internações obtidas pelo Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS) entre residentes no Brasil, de ambos os sexos e todas as faixas etárias, no período de janeiro de 2015 a dezembro de 2024.

Variáveis

A variável dependente foi a taxa de mortalidade por leishmaniose visceral (CID-10: B55.0), calculada como o número de óbitos dividido pela população residente no ano, multiplicado por 10.000 habitantes para a análise espacial bivariada, que também considerou a densidade populacional municipal. Para a análise de tendência temporal por regressão de joinpoint, a mesma taxa foi aplicada, porém multiplicado por 100.000 habitantes para mortalidade. As variáveis independentes incluíram características demográficas (sexo: masculino e feminino; idade em anos; e faixas etárias: 1 a 19 anos, 20 a 59 anos e ≥ 60 anos) e a unidade territorial de residência (municípios e unidades federativas), avaliadas quanto à sua distribuição absoluta e proporcional ao longo do período.

Fontes de dados

Os dados de mortalidade foram obtidos no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), por meio da plataforma TABNET. As estimativas populacionais por município foram extraídas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Os dados e códigos utilizados neste estudo estão disponíveis em repositório público de acesso aberto [12]. Por se tratar de estudo com dados secundários, agregados e de domínio público, sem identificação individual, o trabalho foi dispensado de apreciação por Comitê de Ética em Pesquisa, conforme a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Viés

Considerando a utilização de dados secundários provenientes do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM/DATASUS), o estudo esteve sujeito à possibilidade de sub-registro de óbitos e inconsistências na codificação da causa básica da morte. Além disso, a presença de municípios com ausência de registros ou valores nulos pode ter influenciado a detecção de padrões espaciais locais. Para minimizar potenciais vieses de classificação, foi adotada definição padronizada de caso com base na Classificação Internacional de Doenças (CID-10: B55.0) e utilização de taxas calculadas com denominadores populacionais oficiais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

Tamanho do estudo

O tamanho do estudo correspondeu ao total de registros disponíveis no Sistema de Informações sobre Mortalidade que atenderam aos critérios de elegibilidade no período analisado (2015–2024), caracterizando-se como estudo censitário, não sendo realizado cálculo amostral.

Métodos Estatísticos

A distribuição das taxas de mortalidade foi avaliada pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. A tendência temporal das taxas de mortalidade foi analisada por regressão de joinpoint (modelo de regressão linear segmentada – Joinpoint Regression Program), identificando o número ótimo de pontos de mudança (joinpoints) e calculando a variação percentual anual (APC) para cada segmento, com nível de significância de 5 %. Para comparação entre sexos utilizou-se o teste de Mann–Whitney U; entre faixas etárias, o teste de Kruskal–Wallis seguido de comparações múltiplas. A análise espacial incluiu estimador de densidade de Kernel (raio de 60 km), Índice Global de Moran, Indicadores Locais de Associação Espacial (LISA), estatística local Getis-Ord G_i^* e análise bivariada entre taxas de mortalidade e internação. Adotou-se nível de significância de 5 % em todas as análises. As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism; as espaciais, no GeoDa (v. 1.22.0.21) e QGIS (v. 3.40 LTR). A regressão de joinpoint foi executada no Joinpoint Regression Program.

Resultados

Entre 2015 e 2024, foram registrados 816 óbitos por leishmaniose visceral no Brasil. Houve predomínio do sexo masculino (65,2%), com média anual de óbitos ($53,20 \pm 17,08$), significativamente superior à observada no sexo feminino (34,8%; média anual de $28,40 \pm 11,67$; Mann-Whitney U = 10,50; p = 0,001). A análise por regressão joinpoint identificou redução constante e linear na taxa de mortalidade por 100.000 habitantes ao longo de todo o período (APC = -10,66 %; p = 0,04; Figura 1). Quanto à distribuição etária, a maior proporção de óbitos ocorreu entre adultos de 20 a 59 anos (49,0%; média anual de $40,0 \pm 12,63$), seguida pelas faixas de 60 anos ou mais (25,7%; média anual de $21,0 \pm 4,32$) e de 1 a 19 anos (25,2 %; média anual de $20,60 \pm 12,21$).

A média anual de mortalidade por leishmaniose visceral no Brasil foi maior na região Nordeste, que concentrou 612 óbitos, correspondendo a 75% do total nacional. Em comparação à região Nordeste, as demais regiões registraram menor número de óbitos: Norte 148 (18,1%), Sudeste 32 (3,9%), Centro-Oeste 15 (1,8%) e Sul 9 (1,1%). Na análise por estado, o Maranhão apresentou o maior número de óbitos, com 248 registros (30,4% do total nacional), seguido pelo Piauí com 112 (13,7%) e pelo Ceará, com 98 (12%). Essa distribuição evidencia forte concentração da mortalidade em determinados estados do Nordeste, enquanto a maioria dos demais estados brasileiros registrou taxas muito baixas ao longo de todo o período.

A análise espacial por meio do estimador de densidade Kernel evidenciou distribuição heterogênea da mortalidade por leishmaniose visceral no território brasileiro entre 2015 e 2024, com concentração de áreas de maior intensidade principalmente nas regiões Norte e Nordeste. Destacaram-se municípios localizados nos estados do Maranhão, Piauí, Tocantins e Ceará, além de registros pontuais em Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Ao longo do período, verificou-se ampliação gradual da extensão e da intensidade dos aglomerados de maior densidade, com maior expressão em 2019. Em 2021, observou-se maior concentração espacial desses aglomerados, enquanto nos anos subsequentes houve redução relativa de sua extensão, sem desaparecimento dos principais focos identificados anteriormente. Em 2024, registrou-se nova ampliação da área dos aglomerados,

especialmente no estado do Pará e ao longo do eixo Maranhão-Piauí, além da presença de focos adicionais na região Centro-Oeste. Considerando o período de 2015 a 2024, os mapas de densidade Kernel evidenciaram recorrência espacial das áreas de maior intensidade, com destaque para os estados do Maranhão, Piauí e Ceará, além de registros adicionais em Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (Figura 2).

A análise de autocorrelação espacial local por meio do Índice de Moran Local (LISA), aplicada às taxas suavizadas de mortalidade por leishmaniose visceral em nível municipal, evidenciou um padrão espacial persistente ao longo de todo o período de 2015 a 2024. Constatou-se a manutenção de clusters do tipo alta-alta, caracterizados por municípios com altas taxas de mortalidade circundados por outros municípios também com altas taxas, indicando concentração espacial de áreas de maior risco e sugerindo transmissão sustentada e heterogeneamente distribuída no território. Esses aglomerados permaneceram predominantemente nas regiões Norte e Nordeste, com destaque recorrente para os estados do Pará, Maranhão e Tocantins. Em paralelo, os clusters do tipo baixa-baixa, representados por municípios com baixas taxas cercados por vizinhos igualmente com baixas taxas, mantiveram-se principalmente na região Norte, especialmente no Amazonas, Roraima e Acre. Apesar da estabilidade desse padrão geral, houve variações ao longo do tempo. No período de 2015 a 2019, os clusters alta-alta exibiram distribuição mais pontual, com ocorrência adicional nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, incluindo municípios de Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. No período de 2020 a 2024, observou-se maior consolidação e expansão desses aglomerados, com destaque para novas áreas no Nordeste, especialmente na Bahia, além da manutenção e ampliação no Centro-Oeste, particularmente em Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Figura 3).

A análise de significância estatística confirmou a consistência dos aglomerados espaciais, com níveis significativos para os clusters alta-alta nas regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste, o que reforça a não aleatoriedade e a persistência do risco nessas áreas. Em contrapartida, os clusters baixa-baixa apresentaram distribuição mais dispersa e menos delimitada, sem concentrações tão definidas quanto as observadas para as altas taxas (Figura 4).

Para complementar a análise espacial e verificar a coexistência entre as taxas de internação e mortalidade por leishmaniose visceral, elaborou-se o mapa coroplético bivariado (Figura 5). Observou-se distribuição heterogênea entre os municípios brasileiros, com diferentes combinações entre os dois indicadores. Como a mediana global das taxas foi igual a zero para ambas as variáveis, a dicotomização em valores altos e baixos foi realizada com base na mediana dos valores positivos, permitindo a identificação de quatro padrões bivariados distintos. Houve predomínio de municípios classificados como baixo/baixo, caracterizados simultaneamente por baixas taxas de internação e mortalidade, distribuídos de forma relativamente dispersa pelo território nacional.

Em contrapartida, os municípios classificados como alto/alto apresentaram maior concentração espacial, sobretudo em estados das regiões Norte, Nordeste e em áreas específicas do Centro-Oeste, com destaque para Pará, Maranhão, Tocantins, Piauí, Goiás, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, sugerindo coexistência entre elevada demanda hospitalar e maior ocorrência de óbitos. O padrão baixo/alto, caracterizado por altas taxas de internação e menores taxas de mortalidade, foi identificado principalmente em municípios distribuídos nas regiões Nordeste e Centro-Oeste. Já os municípios classificados como alto/baixo, correspondentes a menores taxas de internação associadas a maior

mortalidade, foram menos frequentes e apresentaram distribuição pontual no território nacional.

Discussão

A análise da mortalidade por leishmaniose visceral no Brasil entre 2015 e 2024 evidenciou tendência de redução das taxas ao longo da série histórica. Observou-se maior ocorrência de óbitos no sexo masculino e predominância na população adulta de 20 a 59 anos. A distribuição espacial da mortalidade apresentou padrão heterogêneo no território nacional, com persistência de áreas de maior concentração principalmente nas regiões Norte e Nordeste. A identificação de aglomerados espaciais estatisticamente significativos de altas taxas reforçou a manutenção de áreas prioritárias nessas regiões. Adicionalmente, a análise bivariada evidenciou diferentes combinações espaciais entre internações e mortalidade nos municípios brasileiros, com concentração de áreas caracterizadas por elevada ocorrência simultânea desses eventos em territórios historicamente vulneráveis, como Alagoas, Paraíba, Tocantins, Piauí, Maranhão e Pará.

Este estudo apresenta limitações relacionadas ao uso de dados secundários provenientes de sistemas de informação em saúde, que podem estar sujeitos a subnotificação, inconsistências de preenchimento e variações na qualidade dos registros entre municípios. Além disso, por se tratar de uma análise baseada em dados agregados, os resultados devem ser interpretados no nível populacional, não sendo possível estabelecer inferências causais em nível individual. A presença de municípios com ausência de registros em determinados períodos pode ter reduzido a sensibilidade das análises espaciais locais. Por outro lado, o estudo apresenta como ponto forte a abrangência nacional, contemplando todos os municípios brasileiros em extensa série temporal. A aplicação integrada de métodos de análise temporal e espacial possibilitou identificar padrões territoriais consistentes e recorrentes da mortalidade por leishmaniose visceral, contribuindo para a compreensão das desigualdades regionais relacionadas à doença no país.

A redução progressiva da mortalidade observada neste estudo pode refletir avanços na vigilância, no diagnóstico e no manejo da leishmaniose visceral no Brasil, incluindo a ampliação da capacidade diagnóstica e a adoção de estratégias de detecção precoce na atenção primária. Soares et al. (2025) demonstraram que, apesar da expansão da leishmaniose visceral para áreas urbanas nas últimas duas décadas, a persistência de taxas de letalidade entre 7% e 9% reforça a importância do diagnóstico precoce. Segundo Duarte et al. (2025), o manejo adequado de grupos de risco, especialmente crianças e idosos, aliado a uma rede assistencial estruturada, contribui para a redução da mortalidade [6,8]. Revisões clínicas e epidemiológicas internacionais, especialmente de países da Ásia (Índia e Nepal) e da África (Etiópia e Sudão), indicam que a ampliação do acesso a terapias específicas, associada a redes assistenciais mais estruturadas, tem contribuído para a redução da mortalidade [3,13,14].

Em escala global, análises recentes da vigilância epidemiológica da World Health Organization indicam redução da carga da leishmaniose visceral em países endêmicos, com queda de aproximadamente 50% no número de casos entre 2012 e 2022, atribuída à implementação de estratégias integradas de controle vetorial, ampliação da cobertura diagnóstica e fortalecimento da vigilância em saúde [5]. Entretanto, esses relatórios

destacam que a distribuição espacial da mortalidade por leishmaniose visceral permanece fortemente associada a desigualdades territoriais, incluindo urbanização desordenada, expansão de áreas periurbanas com reservatórios domésticos, condições ambientais favoráveis ao vetor e limitações no acesso aos serviços especializados de saúde [16,17]. Nesse contexto, a redução observada no Brasil acompanha tendências internacionais, embora persistam focos da doença em territórios historicamente vulneráveis.

A persistência de aglomerados espaciais de mortalidade por leishmaniose visceral nas regiões Norte e Nordeste observada neste estudo é consistente com o padrão epidemiológico historicamente descrito no Brasil, caracterizado pela concentração da doença em territórios marcados por maior vulnerabilidade socioambiental e desigualdades no acesso ao diagnóstico e tratamento. Investigações espaciais realizadas em diferentes escalas territoriais demonstram que a manutenção desses clusters está associada à urbanização desordenada, à dinâmica periurbana da transmissão, às condições ambientais favoráveis ao vetor e às limitações no acesso aos serviços de saúde [7,18].

Além disso, análises epidemiológicas municipais indicam que a mortalidade por leishmaniose visceral permanece concentrada nessas regiões, apesar da ampliação das ações de vigilância e controle, sugerindo que ações de controle vetorial isoladas são insuficientes sem o fortalecimento da rede assistencial e a melhoria das condições de vida da população exposta [19,20]. Nesse contexto, a recorrência espacial desses aglomerados ao longo do período analisado reforça a hipótese de que a distribuição da mortalidade não ocorre de forma aleatória, mas reflete processos territoriais contínuos relacionados à dinâmica de ocupação urbana, à circulação do vetor e à organização regional dos serviços de saúde.

A identificação de aglomerados espaciais estatisticamente significativos neste estudo reforça que a mortalidade por leishmaniose visceral apresenta distribuição territorial estruturada e não aleatória no Brasil, refletindo a interação entre determinantes socioambientais, dinâmica de transmissão vetorial e organização regional dos serviços de saúde. Estudos nacionais de análise espacial têm demonstrado que a persistência desses fatores está associada à presença de áreas periurbanas com infraestrutura sanitária limitada e elevada densidade de reservatórios domésticos, favorecendo a manutenção do ciclo de transmissão no ambiente domiciliar e peridomiciliar [7]. Além disso, investigações ecológicas recentes indicam que a estabilidade desses aglomerados ao longo do tempo está relacionada à heterogeneidade na capacidade de detecção precoce e manejo oportuno dos casos entre municípios brasileiros [20]. Resultados semelhantes foram descritos em países endêmicos da África Oriental, onde a mortalidade média estimada é de 12,5%, sendo fortemente influenciada por fatores de vulnerabilidade territorial, como o acesso limitado a centros de saúde e o diagnóstico tardio [6]. Esses achados reforçam que a persistência espacial da mortalidade por leishmaniose visceral está fortemente condicionada por fatores estruturais.

Os diferentes padrões territoriais de internações e mortalidade observados neste estudo evidenciam a utilidade desses indicadores para avaliar a capacidade de resposta dos sistemas locais de saúde frente à leishmaniose visceral. Estudos epidemiológicos nacionais mostram que a análise integrada desses indicadores permite identificar territórios onde altas taxas de internação coexistem com maior mortalidade, sugerindo atraso diagnóstico e maior gravidade clínica na admissão hospitalar [6]. Revisões recentes também indicam que a relação entre hospitalização e mortalidade pode refletir diferenças regionais na oportunidade de acesso ao diagnóstico laboratorial e à terapêutica específica,

particularmente em áreas com menor densidade de serviços especializados [8,21]. Nesse contexto, municípios que apresentam simultaneamente altas taxas de internação e mortalidade tendem a concentrar populações expostas a condições socioambientais desfavoráveis e maior dificuldade de acesso a cuidados oportunos [22,23]. A identificação desses padrões territoriais reforça o potencial da análise bivariada para a priorização de áreas estratégicas de vigilância e organização da rede assistencial.

A maior mortalidade entre homens observada neste estudo é consistente com achados do Brasil e de outros países endêmicos, como Índia, Etiópia e Sudão, que apontam maior risco de evolução desfavorável nesse grupo. Essa diferença tem sido atribuída, em parte, à maior exposição ocupacional ao vetor em áreas rurais e periurbanas [3]. Além disso, estudos clínico-epidemiológicos indicam que homens apresentam diagnóstico mais tardio, favorecendo a evolução para formas graves da doença [8,25]. Evidências experimentais e observacionais sugerem que diferenças imunológicas relacionadas à resposta ao *Leishmania infantum* podem influenciar a progressão clínica e resposta terapêutica entre os sexos [26].

A predominância de óbitos em indivíduos em idade produtiva acompanha tendências recentes no Brasil, nas quais a expansão da transmissão periurbana tem modificado o perfil etário da doença [6]. Investigações em áreas urbanizadas do Sudeste e Nordeste indicam que a circulação do vetor em ambientes domiciliares tem ampliado a exposição de adultos economicamente ativos [18]. Além disso, comorbidades como desnutrição, coinfeções e doenças metabólicas podem agravar a leishmaniose visceral e aumentar o risco de desfechos desfavoráveis [8,27]. Resultados semelhantes foram descritos em estudos internacionais realizados em áreas de transmissão persistente, especialmente na Índia, Etiópia e Sudão, onde adultos apresentam maior probabilidade de atraso diagnóstico do que crianças [25,28]. Esses achados sugerem que mudanças na dinâmica da transmissão têm ampliado o impacto da doença em adultos economicamente ativos.

Em síntese, a mortalidade por leishmaniose visceral no Brasil apresentou tendência de redução no período analisado, embora persistam aglomerados espaciais e importante heterogeneidade entre municípios. A maior ocorrência de óbitos entre homens e indivíduos em idade produtiva, associada aos diferentes padrões territoriais de internações e mortalidade, reforça a necessidade de fortalecer a vigilância territorial e ampliar o acesso ao diagnóstico e tratamento precoces em áreas prioritárias.

Disponibilidade de dados

O banco de dados e os códigos de análise utilizados na pesquisa estão disponíveis em:

<https://osf.io/2ubs9/>

Registro do protocolo

Por se tratar de estudo observacional com dados secundários agregados e de domínio público, não houve registro prévio de protocolo.

Uso de inteligência artificial generativa

A primeira versão da introdução foi elaborada com auxílio do ChatGPT (<https://chat.openai.com>), com a finalidade de identificar pesquisas mais recentes. Todas as referências citadas neste estudo foram verificadas em texto completo e cada citação foi conferida para assegurar a confiabilidade e a originalidade das afirmações construídas com auxílio de inteligência artificial generativa.

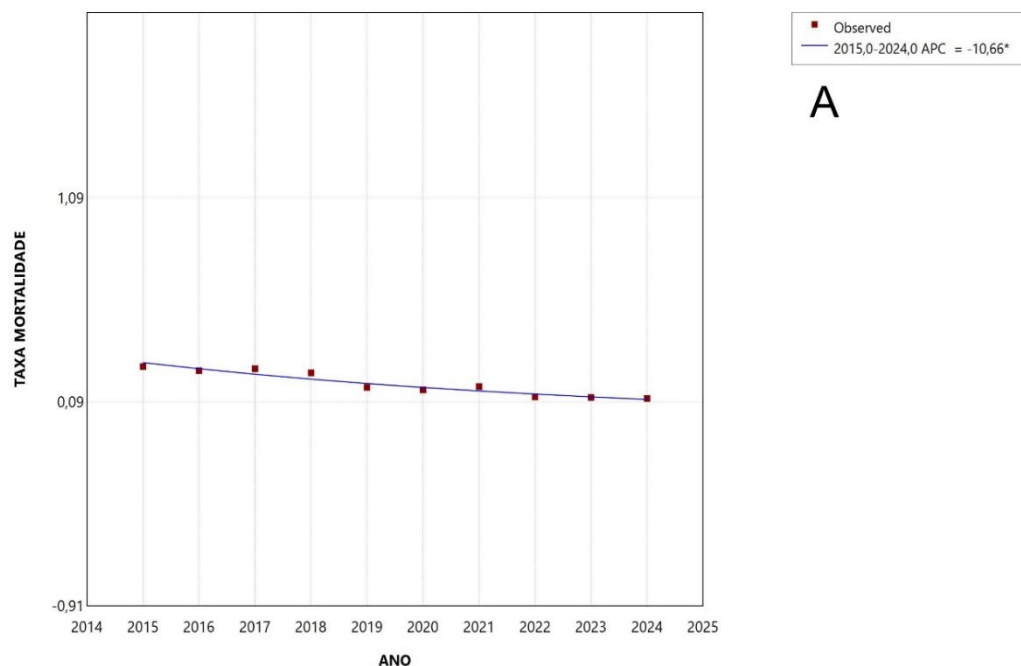
Referências

1. Global leishmaniasis surveillance updates 2023: 3 years of the NTD road map [Internet]. [citado 24 de março de 2026]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer-9945-653-669>
2. Ferro RS, Fonseca ES, Semensati FL, Flores EF, Giufrida R, Hiramoto RM, et al. Geospatial technologies for targeting priority areas on surveillance and response of visceral leishmaniasis in São Paulo state, Brazil: embracing a One Health integrative approach. *J Glob Health*. 25 de julho de 2025;15:04200. doi:10.7189/jogh.15.04200 PubMed PMID: 40708344; PubMed Central PMCID: PMC12290434.
3. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *The Lancet*. 15 de setembro de 2018;392(10151):951–70. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2 PubMed PMID: 30126638.
4. Werneck GL. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*. abril de 2010;26(4):644–5. doi:10.1590/s0102-311x2010000400001 PubMed PMID: 20512199.
5. Global leishmaniasis surveillance updates 2023: 3 years of the NTD road map [Internet]. [citado 24 de março de 2026]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer-9945-653-669>
6. Soares FM de A, Rocha TS, Nascimento ER, Oliveira GL de, Santos MB, Ferreira SR. Human Visceral Leishmaniasis in Brazil in the Past 20 Years: An Epidemiologic Update. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2025;58:e00192025. doi:10.1590/0037-8682-0019-2025 PubMed PMID: 41124534; PubMed Central PMCID: PMC12534024.
7. Graepp-Fontoura I, Soeiro Barbosa D, Nascimento LFC, Fontoura VM, Ferreira AGN, Arrais Sampaio Santos FA, et al. Epidemiological aspects and spatial patterns of human visceral leishmaniasis in Brazil. *Parasitology*. dezembro de 2020;147(14):1665–77. doi:10.1017/S0031182020001754 PubMed PMID: 32951622; PubMed Central PMCID: PMC10317731.
8. Duarte AGS, Werneck GL, de Farias Lelis S, Mendonça TS, Vasconcelos DD, Gontijo TS, et al. An updated systematic review with meta-analysis and meta-regression of the factors associated with human visceral leishmaniasis in the Americas. *Infect Dis Poverty*. 30 de janeiro de 2025;14(1):4. doi:10.1186/s40249-025-01274-z
9. Yeshaw Y, Tsegaye AT, Nigatu SG. Incidence of Mortality and Its Predictors Among Adult Visceral Leishmaniasis Patients at the University of Gondar Hospital: A Retrospective Cohort Study. *Infect Drug Resist*. 2020;13:881–91. doi:10.2147/IDR.S245991 PubMed PMID: 32273732; PubMed Central PMCID: PMC7102893.
10. Dhamnetiya D, Bhattacharyya K, Jha RP, Shri N, Singh M, Patel P. Long-term trends of visceral leishmaniasis incidence and mortality in India 1990-2019: an application of joinpoint and age-period-cohort analysis. *BMC Infect Dis*. 29 de setembro de 2025;25(1):1176. doi:10.1186/s12879-025-10751-7 PubMed PMID: 41023664; PubMed Central PMCID: PMC12482584.
11. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, et al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol*. abril de 2008;61(4):344–9. doi:10.1016/j.jclinepi.2007.11.008 PubMed PMID: 18313558.
12. Galvão K, Straioto Salomão A, Bastianini ME, Pecin I, Favareto AP, Rossi RC, et al. Leishmaniose visceral no Brasil: análise temporal e espacial da mortalidade, 2015-2024 [Internet]. 2026

- [cited 21 May 2026]. Disponível em: <https://osf.io/2ubs9/>.
<https://doi.org/10.17605/OSF.IO/2UBS9>
13. Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML de, Sena JM de, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saúde Pública*. 2008;24:2941–7. doi:<https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200024>
 14. Marchi MNA de, Caldart ET, Martins FDC, Freire RL. Spatial analysis of leishmaniasis in Brazil: a systematized review. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2019;61:e68. doi:<https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961068>
 15. Nascimento M, Fonseca F, Veloso F, Viana G, Silva Pessoa I, Sousa Y, et al. Comparação das Internações e dos Óbitos por Leishmaniose Visceral, Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Mucocutânea por Macrorregiões Brasileiras. *PSYCHTECH & HEALTH JOURNAL*. 30 de setembro de 2023;7:41–50. doi:10.26580/PTHJ.art57-2023
 16. Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ, et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. Tollman S, organizador. *eLife*. 27 de junho de 2014;3:e02851. doi:10.7554/eLife.02851
 17. Fenwick A. The global burden of neglected tropical diseases. *Public Health*. março de 2012;126(3):233–6. doi:10.1016/j.puhe.2011.11.015 PubMed PMID: 22325616.
 18. Prestes-Carneiro LE, Daniel LAF, Almeida LC, D'Andrea LZ, Vieira AG, Anjoletto IR, et al. Spatiotemporal analysis and environmental risk factors of visceral leishmaniasis in an urban setting in São Paulo State, Brazil. *Parasit Vectors*. 21 de maio de 2019;12(1):251. doi:10.1186/s13071-019-3496-6 PubMed PMID: 31113445; PubMed Central PMCID: PMC6528369.
 19. Cruz C da SS, Cardoso DT, Ferreira Júnior CL, Barbosa DS, Carneiro M. Spatial and spatiotemporal patterns of human visceral leishmaniasis in an endemic southeastern area in countryside Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2022;55:e0702. doi:<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0702-2021>
 20. Nunes BEBR, Leal TC, de Paiva JPS, da Silva LF, do Carmo RF, Machado MF, et al. Social determinants of mortality due to visceral leishmaniasis in Brazil (2001-2015): an ecological study. *Rev Soc Bras Med Trop*. 53:e20190262. doi:10.1590/0037-8682-0262-2019 PubMed PMID: 31859950; PubMed Central PMCID: PMC7083365.
 21. Abongomera C, Henten S van, Vogt F, Buyze J, Verdonck K, Griensven J van. Prognostic factors for mortality among patients with visceral leishmaniasis in East Africa: Systematic review and meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 15 de maio de 2020;14(5):e0008319. doi:10.1371/journal.pntd.0008319
 22. Martins-Melo FR, Lima M da S, Jr ANR, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality and Case Fatality Due to Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Nationwide Analysis of Epidemiology, Trends and Spatial Patterns. *PLOS ONE*. 3 de abril de 2014;9(4):e93770. doi:10.1371/journal.pone.0093770
 23. Sundar S. Treatment of visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol*. novembro de 2001;190(1–2):89–92. doi:10.1007/s004300100088 PubMed PMID: 11770119.
 24. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*. 2014;6:147–54. doi:10.2147/CLEP.S44267 PubMed PMID: 24833919; PubMed Central PMCID: PMC4014360.
 25. Druzian AF, Souza AS de, Campos DN de, Croda J, Jr MGH, Dorval MEC, et al. Risk Factors for Death from Visceral Leishmaniasis in an Urban Area of Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 14 de agosto de 2015;9(8):e0003982. doi:10.1371/journal.pntd.0003982
 26. Velásquez GE, Aibana O, Ling EJ, Diakite I, Mooring EQ, Murray MB. Time From Infection to Disease and Infectiousness for Ebola Virus Disease, a Systematic Review. *Clin Infect Dis*. 1º de outubro de 2015;61(7):1135–40. doi:10.1093/cid/civ531

27. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLOS ONE. 31 de maio de 2012;7(5):e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
28. Control of the leishmaniasis WHO TRS n° 949 [Internet]. [citado 24 de março de 2026]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-TRS-949>

Tabelas e figuras



A

Figura 1. Variação percentual anual da taxa de mortalidade por leishmaniose visceral (100 mil habitantes) 2015-2024. Brasil, (n=816).

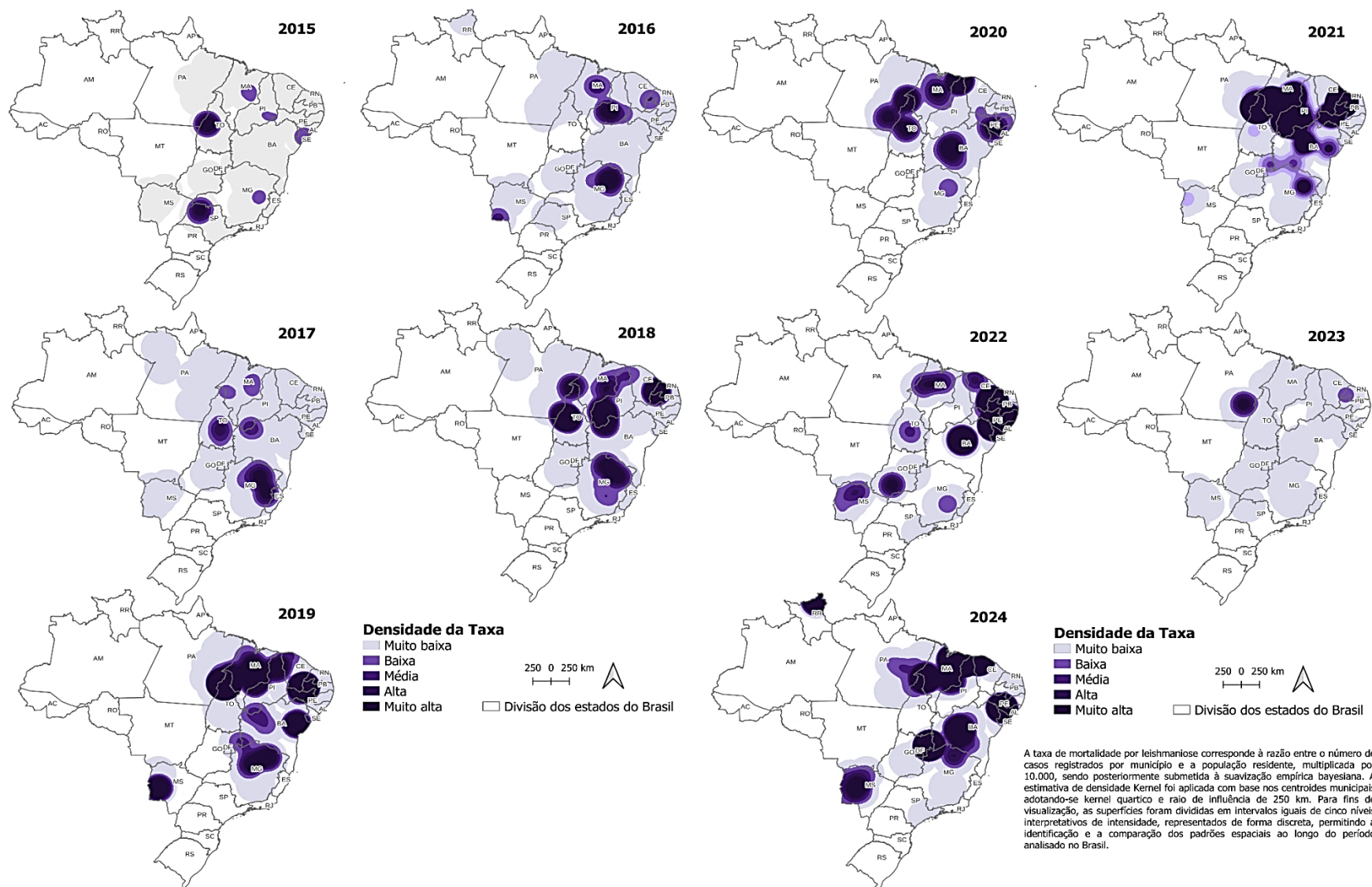


Figura 2. Distribuição por densidade da mortalidade por leishmaniose visceral, 2015-2024. Brasil, (n=816)

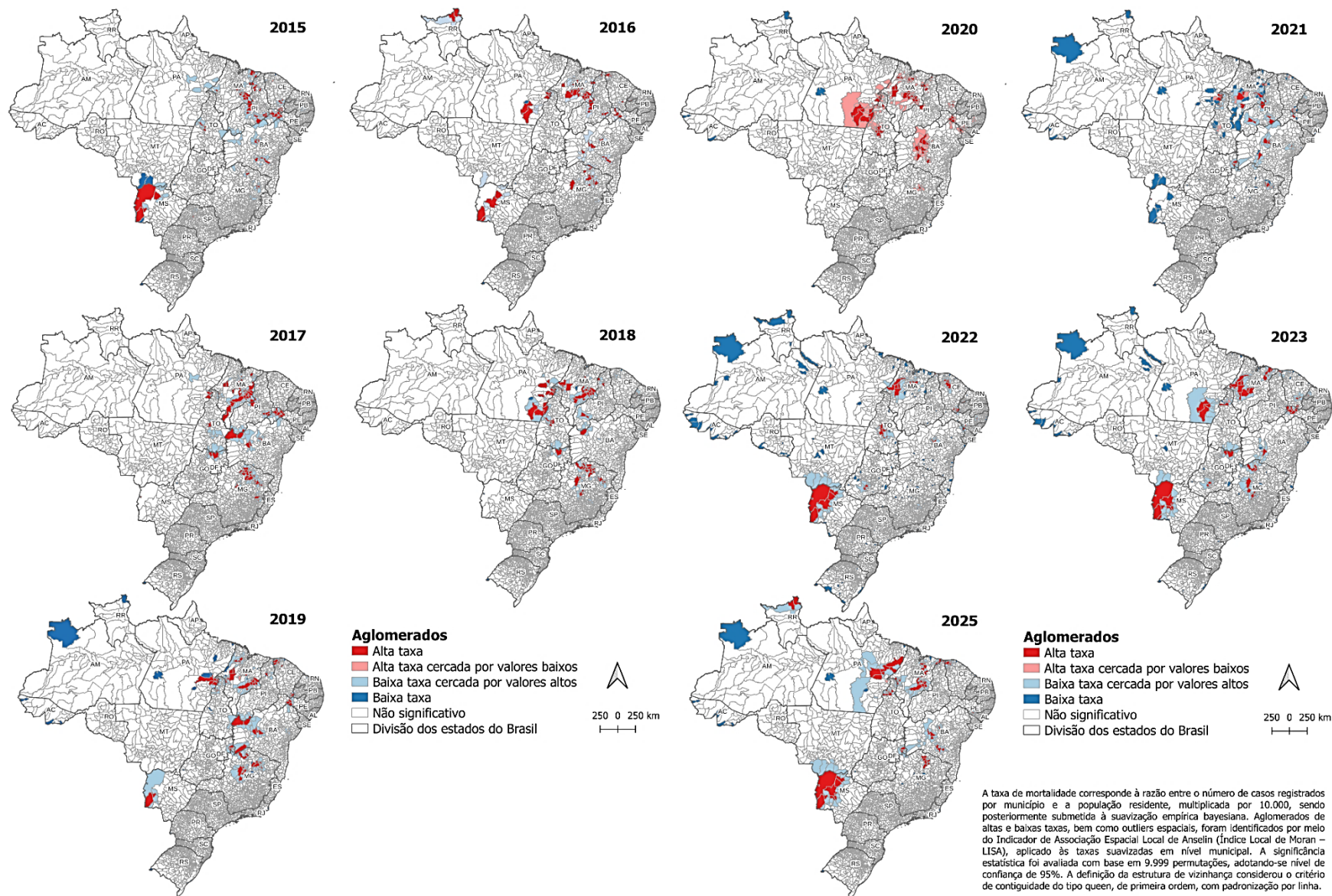


Figura 3. Autocorrelação espacial local da mortalidade por leishmaniose visceral nos municípios brasileiros segundo o índice de Moran local (LISA), 2015–2024. Brasil, (n=816).

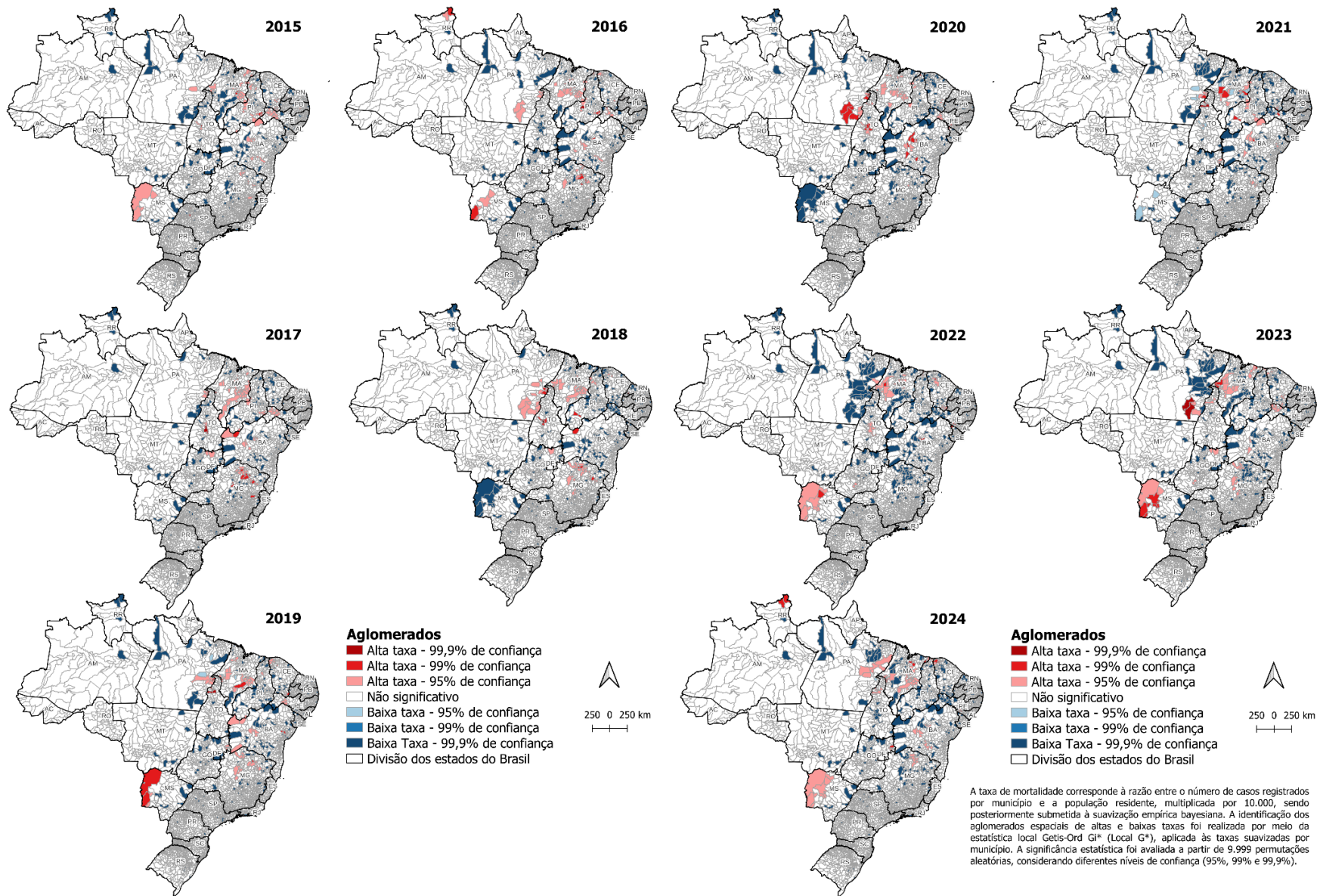
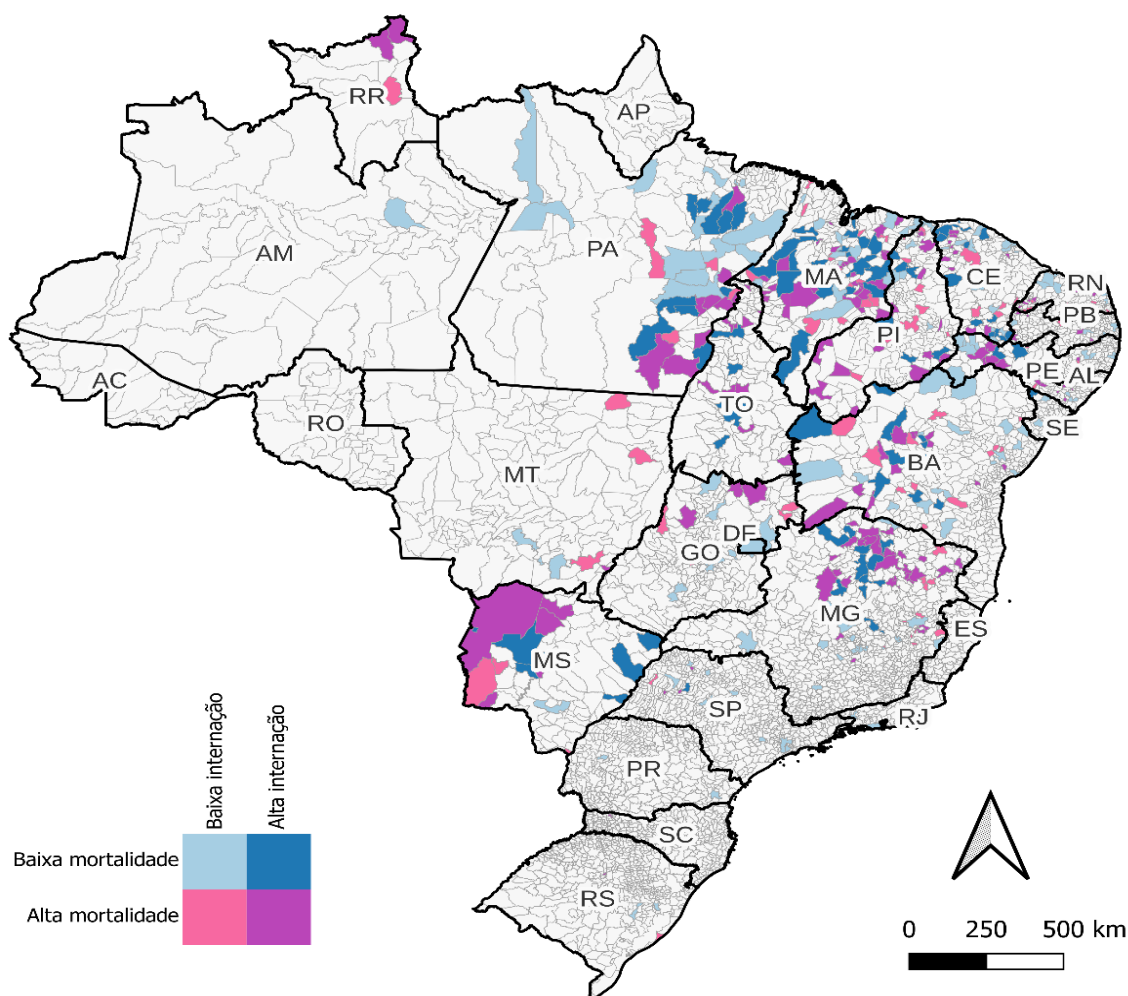


Figura 4. Distribuição espacial dos aglomerados da mortalidade por leishmaniose visceral segundo estatística de varredura espacial, Brasil, 2015-2024. Brasil (n=816).



As taxas médias de internação e mortalidade por leishmaniose (2015–2024) foram representadas em mapa bivariado em nível municipal. Diante da mediana igual a zero para ambos os indicadores, a dicotomização em alta e baixa foi realizada com base na mediana dos valores positivos, resultando em quatro combinações entre os indicadores: baixa internação/baixa mortalidade, alta internação/baixa mortalidade, baixa internação/alta mortalidade e alta internação/alta mortalidade.

Figura 5. Relação espacial entre as taxas de mortalidade e internações por leishmaniose visceral 2015-2024. Brasil, (n=816).

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 82/2019

Londrina, 24 de junho de 2019.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "Efeitos do uso de dimesilato de lisdexanfetamina sobre o desenvolvimento pós natal do sistema genital masculino de ratos" protocolo CEUA nº 9633.2019.65 sob a responsabilidade de **Glaura Scantamburlo Alves Fernandes**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), 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), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião de 18/06/2019.

Este projeto tem por objetivo analisar a morfologia, funcionalidade, perfil inflamatório e estresse oxidativo do testículo, epidídimo e próstata; avaliar a morfologia e funcionalidade do ducto deferente; qualidade espermática; função hepática e renal; determinar a concentração plasmática de hormônios e investigar o comportamento sexual de ratos *Wistar* submetidos a gavagem com dimesilato de lisdexanfetamina em dois momentos distintos: na peripuberdade (DPN 66), imediatamente após o término do período de administração do fármaco, e na vida adulta (DPN 131), após um período de 65 dias de recuperação do tratamento. Grau de invasividade: I.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/09/2019 a 01/08/2023
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogêneo: Wistar
Nº de animais	80 machos de 22 dias e 40 fêmeas de 60 dias
Peso/ Idade	-/ 22 dias -/ 60 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central do CCB
Amostras a serem coletadas	Sangue, testículos, epidídimos, próstatas, ducto deferentes, fígado, rins.

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
Prof.ª Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Prof.ª Dr.ª Maria Fernanda
Rodrigues Graciano
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3371-8454

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). **Glaura Scantamburlo Alves Fernandes**
Responsável pelo projeto
Departamento de Biologia Geral/CCB
C/C para a Chefia do Depto. de Biologia Geral/CCB
C/C para a Direção de Centro do CCB
C/C Biotério Central do CCB

ANEXO B - INSTRUÇÕES PARA AUTORES DA REVISTA LIFE SCIENCES

About the journal

Aims and scope

Life Sciences is an international journal publishing articles that emphasize the **molecular, cellular, and functional basis of therapy**. The journal emphasizes the understanding of mechanism that is relevant to all aspects of human disease and translation to patients. All articles are rigorously reviewed.

The Journal favors publication of full-length papers where modern scientific technologies are used to explain **molecular, cellular and physiological mechanisms**. Articles that merely report observations are rarely accepted. Recommendations from the Declaration of Helsinki or NIH guidelines for care and use of laboratory animals must be adhered to. Articles should be written at a level accessible to readers who are non-specialists in the topic of the article themselves, but who are interested in the research. The Journal welcomes reviews on topics of wide interest to investigators in the **life sciences**. We particularly encourage submission of brief, focused reviews containing high-quality artwork and require the use of mechanistic summary diagrams.

Manuscripts should present novel preclinical findings addressing questions of **biological significance to human disease**. Studies that fail to do so may be rejected without review. Quantitative conclusions must be based on truly quantitative methods. *Life Sciences* does not publish work on the actions of biological extracts of unknown chemical composition. Compounds studied must be of known chemical structure and concentration. The study must be reproducible; materials used must be available to other researchers so they can repeat the experiment. Clinical studies may be considered if they expand understanding of mechanism, but the journal does not encourage clinical trial reports.

Four common reasons for rejection include: out of scope (the manuscript does not conform to the goal of identification of mechanisms related to therapy for human disease); too preliminary (manuscript is based on a limited amount of experimental data diminishing significance); lack of novelty (manuscript is well done but does not

address a significant question); unidentified structure (actions of biological extracts of unknown chemical composition).

Language

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). For language assistance, please see Language Services, above. Use decimal points (not decimal commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Article types

- **Original research articles**
- **Reviews** - Review articles' main text (reference excluded) should have a maximum word count of 5,500 and contain no more than 100 references.

Word count includes text + displayed math + figures + tables.

Peer review

This journal follows a single anonymized review process. Your submission will initially be assessed by our editors to determine suitability for publication in this journal. If your submission is deemed suitable, it will typically be sent to a minimum of two reviewers for an independent expert assessment of the scientific quality. The decision as to whether your article is accepted or rejected will be made by our editors.

Read more about [peer review](#).

Our editors are not involved in making decisions about papers which:

- they have written themselves.
- have been written by family members or colleagues.
- relate to products or services in which they have an interest.

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

Authors may submit a formal appeal request to the editorial decision, provided it meets all the requirements and follows the procedure outlined in [Elsevier's Appeal](#)

[Policy](#). Only one appeal per submission will be considered and the appeal decision will be final.

Special issues and article collections

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

Open access

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

Ethics and policies

Ethics in publishing

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

Submission declaration

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

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

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

Authorship

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

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

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

Authors should appoint a single corresponding author to communicate with the journal during the editorial process. This individual submits the manuscript and all required documentation to the journal, and serves as the primary contact between the journal and the co-authors. Only the corresponding author's affiliation will be used to determine eligibility for a publishing agreement, and possible discounts related to it. Affiliations of other co-authors are not relevant for eligibility.

Changes to authorship

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

The policy of this journal around authorship changes:

- All authors must be listed in the manuscript and their details entered into the submission system. Changes can only be made prior to acceptance, and only if approved by the journal editor. This includes additions, deletion, or rearrangement of author names.
- Requests to change authorship must be made by the corresponding author using the [Authorship Change Request form](#). The corresponding author must provide the reason for the request to the journal editor with written confirmation from all authors, including any authors being added or removed, that they agree with the changes. Requests which do not comply with the instructions outlined in the form will not be considered.

- This journal does not allow authorship changes after acceptance. This includes additions, deletions, or the rearrangement of author names, including changes to the corresponding author.
- The review process may be paused while a change in authorship request is being considered.
- Change requests made by the authors without the [Authorship Change Request form](#) or editor approval may result in the rejection of the manuscript, or retraction if the article has already been published.

Declaration of competing interests

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

- Employment
- Consultancies
- Stock ownership
- Honoraria
- Paid expert testimony
- Patent applications or registrations
- Grants or any other funding
- Affiliation with the journal as an Editor or Advisory Board Member

The [declarations tool](#) should always be completed.

Authors with a journal affiliation to declare should enter the following text under “Other Activities” within the [declarations tool](#) and should inform the journal and publisher prior to completing the submission process:

Given their role as [AUTHOR JOURNAL ROLE TITLE], [AUTHOR NAME] had no involvement in the peer-review of this article and has no access to information regarding its peer-review. Full responsibility for the editorial process for this article was delegated to another journal editor.

Editorial disclosure statements will be included as a footnote and/or in the declaration of competing interest section of the article.

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

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

Funding sources

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

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

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

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

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

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

Declaration of generative AI use

Authors must declare the use of generative AI tools in the manuscript preparation process upon submission of the paper.

Generative AI and AI-assisted technologies (“AI tools”) have been rapidly adopted in research and scholarly publishing, offering significant benefits while requiring clear standards for responsible and transparent use.

Authors preparing a manuscript for this journal may use AI tools to support them. However, these tools must never be used as a substitute for human critical thinking, expertise and evaluation. AI tools may only be applied with human oversight and control.

Please read Elsevier’s detailed author policy on the use of AI tools, as stated in [Elsevier’s generative AI policies for journals](#).

Ultimately, authors are responsible and accountable for the contents of their work. This includes accountability for:

- Carefully reviewing and verifying the accuracy, comprehensiveness, and impartiality of all AI-generated output (including checking the sources, as AI-generated references can be incorrect or fabricated).
- Editing and adapting all material thoroughly to ensure the manuscript represents the author’s authentic and original contribution and reflects their own analysis, interpretation, insights and ideas.
- Ensuring accuracy and originality of any AI generated images and provide appropriate attribution where relevant.
- Ensuring the use of any tools or sources, AI-based or otherwise, is made clear and transparent to readers. If AI tools have been used, we require a disclosure statement upon submission; please see example below.
- Ensuring the manuscript is developed in a way that safeguards data privacy, intellectual property and other rights, by checking the terms and conditions of any AI tool that is used.

Finally, authors must not list or cite AI tools as an author or co-author on the manuscript since authorship implies responsibilities and tasks that can only be attributed to, and performed by, humans.

The use of AI tools in the manuscript preparation process must be declared by adding a statement at the end of the manuscript when the paper is first submitted.

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

Title of new section: *Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the manuscript preparation process.*

Statement: *During the preparation of this work the author(s) used [NAME OF TOOL / SERVICE] in order to [REASON]. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the published article.*

The declaration does not apply to the use of basic tools, such as tools used to check grammar, spelling and references. In addition, authors are not required to disclose the use of AI tools or features within specialist disability-related assistive technology, provided these are used solely for accessibility purposes.

If you have nothing to disclose, you do not need to add a statement.

Please note: to protect authors' rights and the confidentiality of their research, this journal does not currently allow academic editors and reviewers to upload an unpublished manuscript into a generative AI tool, as is stated in [Elsevier's generative AI policies for journals](#). However, AI tools may be used in a supportive capacity by editors and reviewers to improve structure and language of the review report or editorial decision letter or to conduct a background literature search. Elsevier is actively evaluating compliant AI tools and may revise this policy in the future.

Preprints

Preprint sharing

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

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

In support of [Open Science](#), this journal offers its authors a free preprint posting service on [SSRN](#), Elsevier's preprint and early research repository.

During submission to this journal, you can choose to post your manuscript on SSRN, and it will be made publicly available as soon as it passes the journal's initial desk review.

As a preprint on SSRN, your manuscript will benefit from:

- Early registration with a preprint DOI (Digital Object Identifier)
- A link from the preprint to the version of record if published in this Elsevier journal
- Preprint posting, sharing, and download availability that facilitates collaboration and early citations

Your decision to post or not post your preprint will have no effect on the editorial process or publication outcome with the journal. For additional information, please consult the [SSRN Terms of Use](#) and [FAQs](#).

It is expected that the corresponding author will seek approval from all co-authors before agreeing to post the manuscript publicly, prior to peer review, on SSRN.

Use of inclusive language

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

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

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

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

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

Reporting sex- and gender-based analyses

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

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

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

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

Definitions of sex and/or gender

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

- Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features such as chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy. A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth") and is in most cases based solely on the visible external anatomy of a newborn. In reality, sex categorizations include people who are intersex/have differences of sex development (DSD).

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

Depending on the focus of a paper, sex and/or gender may or may not be relevant to the content of the paper. We recognize that beliefs, attitudes, and laws relating to sex and gender may vary. These articles do not attempt to dictate author beliefs but rather require that, where relevant to an author's research or paper, the author must provide clear explanations of how the paper and research define and use sex and gender.

Jurisdictional claims

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

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

Studies in humans

Authors must follow [ethical guidelines](#) for research involving humans, their data, and/or their biological materials (e.g. organs, tissues). Authors should ensure that they adhere to the following:

- All studies must be performed in compliance with relevant laws, regulations, and institutional guidelines and that the appropriate institutional committee(s) has/have approved them. For instance, medical research involving humans should be carried out in accordance with the World Medical Association [Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human participants](#) and should follow the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [recommendations for the conduct, reporting, editing and publication of scholarly work in medical journals](#) and aim to be representative of human populations in terms of sex, age and ethnicity. Sex and gender terms should be used correctly, as outlined in the “Reporting Sex- and Gender-based analyses” section of this journal’s Guide for Authors.
- Informed consent must be obtained for research with human participants, including their data or biological materials. Consent must be given without coercion, and the privacy rights of human participants must always be observed. If your study contains human participants, please read Elsevier’s full [human research policy](#) for further information.
 - Authors should be aware that written (or electronic) consent is required for certain studies under national laws. In studies where only verbal informed consent was obtained, authors should include justification for the absence of written consent, the name of the approving ethics committee, and a statement on how verbal consent was recorded.
 - Consent for publication should also be obtained.
- Authors must obtain and retain explicit written consent for any identifiable participant materials (e.g. case details, videos, recordings, images, photographs, and illustrations). All participant information must be de-

identified: do not include names or personal identifiers (e.g., initials, ID numbers, DOB)

- Images should be used only when scientifically necessary and with explicit consent, and nonessential identifying details must be removed. If identifiers are altered to ensure anonymity, authors must confirm that scientific meaning is not affected. Fully anonymized images (e.g., x-rays, scans) that contain no identifying marks and are not accompanied by identifying text do not require formal consent, though informing the patient is good practice. Case reports always require consent. Simply obscuring identity (e.g., eye bars or blurring) is not sufficient without consent.
- Written consents must be retained by the authors. They should not be provided to this journal unless this is specifically requested in exceptional circumstances, for example, when a legal issue arises. Only then should you provide copies of the consents, or evidence that all relevant consents were obtained.
- Appropriate consents and safeguards should be in place for research with vulnerable populations, as described in Elsevier's [human research policy](#). In many countries, additional ethical approval may be needed for research with those who lack the capacity to consent (e.g. children or those with mental health or neurological conditions including dementia).
- For the full policy, see [“Consent requirements for case reports, personal information, and images.”](#)

All studies involving human participants require a statement that details any ethical approval(s), guidelines followed, confirmation of informed consent, and any other necessary information in line with Elsevier's [human research policy](#). The statement should contain the date and reference number of any ethical approval(s) obtained. If ethical approval is not required by national laws or where a study has been granted an exemption from an ethics committee, the statement must explain why the study is exempt and confirm that the appropriate protocols for protecting the rights and privacy of all participants were utilized during the execution of the research (e.g. no coercion to participate, full disclosure of study requirements and

risks, consent of participants (or their Legal Representatives), no release of participant data without their knowledge, etc.).

Human biological material

For all studies that use human organs or tissues, sufficient evidence must be provided that these were procured in line with [WHO Guiding Principles on Human Cell, Tissue and Organ Transplantation](#). The source of the organs or tissues used in clinical research must be transparent and traceable and must not be sourced from executed prisoners or prisoners of conscience, consistent with recommendations by [Global Rights Compliance on Mitigating Human Rights Risks in Transplantation Medicine](#).

For clinical studies, a statement of informed consent having been obtained from a patient or their legal representative, paired with ethical approval for the study from a suitable institution, as required by the policies of the journal, may be considered sufficient evidence, but the journal reserves the right to request additional evidence in cases where it feels this is not sufficient.

If the manuscript describes organ transplantation authors must additionally declare within the manuscript that:

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

Clinical Trials

This journal follows the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) clinical trials registration guidelines](#).

Registration

Clinical trials must be registered in a public trials registry. Purely observational studies, in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator, do not require registration.

Some important points:

- Trials must be registered at or before the onset of patient enrolment.

- The clinical trial registration number must be included in the manuscript, preferably at the end of the article abstract.
- A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants, or groups of humans, to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes.
- Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome such as drugs, surgical procedures, devices, behavioral treatments, dietary interventions, and process-of-care changes.
- Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events.

Results

Authors are required to disclose all posting in registries of results of the same or closely related work. Editors will not consider results to be a prior publication if they have already been posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides, as long as the results are presented in the form of a brief structured abstract (fewer than 500 words) or table.

Disclosing results in other circumstances, such as in an investors' meeting, for example, is discouraged and may jeopardize consideration of your manuscript by this journal.

Reporting

Authors are encouraged to follow CONSORT guidelines when presenting randomized controlled trials, and provide the CONSORT checklist at manuscript submission, with an accompanying flow diagram illustrating the progress of patients through the trial - including recruitment, enrolment, randomization, withdrawal, completion and a description of the randomization procedure.

- Read the [CONSORT guidelines](#).
- Follow the [CONSORT checklist](#).

Delayed publication

If you need to delay the publication of your article for any reason, please contact the editorial office of the journal or our [Journal Article Publishing Support Center](#) at the earliest possible opportunity. While we will try to ensure that your article is not published before a certain date if you make your request on a timely basis, we cannot guarantee this. Please also note that once the agreed period of delay has expired the article may be published at any time thereafter.

Writing and formatting

File format

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

- Save files in an editable format, using the extension .doc/.docx for Word files and .tex for LaTeX files. A PDF is not an acceptable source file.
- Format Word files in a single-column layout. Double-column formatting is only permitted for LaTeX submissions.
- Remove any strikethrough and underlined text from your manuscript, unless it has scientific significance related to your article.
- Use spell-check and grammar-check functions to avoid errors.

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

Title page

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

- Article title. Article titles should be concise and informative. Please avoid abbreviations and formulae, where possible, unless they are established and widely understood, e.g. DNA.
- Author names. Provide the given name(s) and family name(s) of each author. The order of authors should match the order in the submission system. Carefully check that all names are accurately spelled. If needed, you can add your name between parentheses in your own script after the English transliteration.
- Affiliations. Add affiliation addresses, referring to where the work was carried out, below the author names. Indicate affiliations using a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the

corresponding address. Ensure that you provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the email address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence for your article at all stages of the refereeing and publication process and also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about your results, data, methodology and materials. It is important that the email address and contact details of your corresponding author are kept up to date during the submission and publication process.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in your article was carried out, or the author was visiting during that time, a "present address" (or "permanent address") can be indicated by a footnote to the author's name. The address where the author carried out the work must be retained as their main affiliation address. Use superscript Arabic numerals for such footnotes.

Abstract

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

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

Keywords

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

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

Highlights

You are required to provide article highlights at submission.

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

Some guidelines:

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

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

Tables

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

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

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

Figures, images and artwork

Figures, images, diagrams and other graphical media (artwork) must be supplied as separate files along with the manuscript, in line with these [artwork and media instructions](#). Some excerpts:

When submitting artwork:

- Cite all images in the manuscript text.
- Number images according to the order they appear within your article.

- Submit each image as a separate file using a logical naming convention for your files (for example, Figure_1, Figure_2 etc).
- Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX, text graphics may also be embedded in the file.

Captions

All artwork must have a caption. A caption should consist of a brief title (not displayed on the figure itself) and a description of the image. Keep the amount of text in any image to a minimum, though any symbol or abbreviation should be explained.

Read how to add captions to your submission [here](#).

Formats

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

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

Please do not submit:

- Files that are too low in resolution.
- Artwork where text is disproportionately small compared to the image size, as text may become unreadable.
- Different images or graphs combined into one, as this affects accessibility

Color artwork

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

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

Generative AI and Figures, images and other artwork

Please read our policy on the use of generative AI and AI-assisted tools in figures, images and artwork, which can be found in Elsevier's [GenAI Policies for Journals](#).

This policy states:

- AI tools may be used to support the creation of explanatory images (such as flow charts, conceptual diagrams, or schematic illustrations)
- AI tools may be used to create data visualizations (such as plots, charts, graphs, or heatmaps) when the output is directly derived from underlying data using reproducible analytical, computational, or statistical methods.
- AI tools must not be used to create or alter images that represent primary observed or experimental data (such as western blots, microscopy images, histology images, or patient images) that were not directly obtained in the research. This includes adjustments to brightness, contrast, or color balance, which should only be done using established image processing software.
- This policy does not prevent the use of AI tools in formal research design or research methods (such as in AI-assisted imaging approaches used for collection and/or interpretation of the underlying research data or predictive modelling of clinical outcomes based on patient data).

Authors are responsible for ensuring the accuracy and originality of all images submitted for publication. If you used generative AI tools to create images in your manuscript, you should disclose this in each image caption as well as in the general Generative AI disclosure statement.

Supplementary material

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

- Supplementary material should be accurate and relevant to the research.

- Cite all supplementary files in the manuscript text.
- Submit all supplementary materials at the same time as your manuscript.
- Include a concise, descriptive caption for each supplementary file, describing its content.
- After submission supplementary files can only be added or replaced in the revision stage of the editorial process.
- Be aware that all supplementary materials provided will appear online in the exact same way as received. These files will not be checked, formatted or typeset by the production team.

Video

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

- When including video or animation file links within your article, refer to the video or animation content by adding a note in your text where the file should be placed.
- Clearly label files ensuring the given file name is directly related to the file content.
- Provide files in one of our [recommended file formats](#). Files should be within our preferred maximum file size of 150 MB per file, 1 GB in total.
- Provide "stills" for each of your files. These will be used as standard icons to personalize the link to your video data. You can choose any frame from your video or animation or make a separate image.
- Provide descriptive text in your manuscript to refer to the video content. This text helps ensure accessibility for visually impaired readers who rely on descriptive information. For journals publishing in print this is also essential, as video and animation files cannot be embedded in the print version.

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

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

Research data

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

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

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

Research data deposit, citation and linking

For this journal, **Option B** instructions from our [research data guidelines](#) apply. This means that you are **encouraged** to:

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

Data statement

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

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

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

Data linking

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

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

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

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

Co-submission of related data, methods or protocols

You are encouraged to publish a description of your research data, methods, or protocols related to your regular article as a co-submission article in [Data in Brief](#) or [MethodsX](#).

This co-submission can be submitted at the same time as your regular manuscript submission to this journal. If both your regular and co-submitted manuscripts are accepted for publication, they will be linked together on ScienceDirect, thereby promoting research reproducibility, interoperability, and open science.

- Prepare a separate manuscript describing your research data, methods, or protocols using the **mandatory templates** from [Data in Brief](#) or in [MethodsX](#).
- Submit this co-submission alongside your regular manuscript as a separate submission item; on the '**Attach files**' page in Editorial Manager, after which it will be automatically forwarded to the *Data in Brief* or *MethodsX* and assigned an editor.
- For associated Article Processing Charge (APC) details, please visit:
 - [MethodsX](#)
 - [Data in Brief](#)

Please note: Due to the automated process of submitting to *Data in Brief* or *MethodsX*, only after acceptance will you be presented with a personalized

OA Article Publishing Charge based on your individual context (your country, institutional affiliation, and any society membership for example).

Please visit [co-submission Researcher Support page](#) for more information on how to submit a co-submission.

Journal specific information: Writing and formatting

Raw data of Western Blots Images

Life Sciences requires submission of the whole uncropped images of the original western blots in triplicate that contributed to the quantitative analysis, from which figures have been derived. Please submit as Supplementary Figure(s). Please compile all images into the same WORD file. Uploading separate western blots images would delay the editorial speed.

Please note that this is mandatory when western blots are included in the manuscript. Please see [Example of original western blot for three repeats](#)

Article structure

Article sections

Divide your manuscript into clearly defined sections covering all essential elements using headings.

Acknowledgements

Include any individuals who provided you with help during your research, such as help with language, writing or proof reading, in the acknowledgements section.

Acknowledgements should be placed in a separate section which appears directly before the reference list. Do not include acknowledgements on your title page, as a footnote to your title, or anywhere else in your article other than in the separate acknowledgements section.

Author contributions: CRediT

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

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Funding acquisition

- Investigation
- Methodology
- Project administration
- Resources
- Software
- Supervision
- Validation
- Visualization
- Writing – original draft
- Writing – review and editing

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

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

Appendices

We ask you to use the following format for appendices:

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

Journal specific information: Article structure

Results and Discussion: The content of the results and discussion should be presented in separate sections within the main text of the manuscript.

References

References within text

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

- References cited in your abstract must be given in full.

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

Linking to cited sources will increase the discoverability of your research. We encourage the use of Digital Object Identifiers (DOIs) as reference links, as they provide a permanent link to the electronic article referenced.

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

Reference format

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

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

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

Reference style

Indicate references by adding a number within square brackets in the text. You can refer to author names within your text, but you must always give the reference

number, e.g., "as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result".

Number references in the order they appear in your article.

Abbreviate journal names according to the [List of Title Word Abbreviations](#) (LTWA).

Examples:

Reference to a journal publication:

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

Reference to a journal publication with an article number:

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

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in a book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2020, pp. 281 - 304.

Reference to a website:

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

Reference to a dataset:

[6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions [dataset], Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.1234/abc12nb39r.1>.

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S.

Painter, E. Jafarov, S. Molins, Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 [software], Zenodo, March 25, 2020. <https://doi.org/10.1234/zenodo.3727209>.

Web references

When listing web references, as a minimum you should provide the full URL and the date when the reference was last accessed. Additional information (e.g. DOI, author names, dates or reference to a source publication) should also be provided, if known.

You can list web references separately under a new heading directly after your reference list or include them in your reference list.

Data references

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

When citing data references, you should include:

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

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

Preprint references

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

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

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

Reference management software

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

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

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

Submitting your manuscript

Submission checklist

Before completing the submission of your manuscript, we advise you to read our submission checklist:

- One author has been designated as the corresponding author and their full contact details (email address, full postal address, and phone numbers) have been provided. Only the corresponding author's affiliation will be used to determine eligibility for the publishing agreement.
- All files have been uploaded, including artwork, videos, and supplementary materials. Don't forget to include tables and footnotes in the files, and to submit captions.
- Spelling and grammar checks have been carried out.
- All references in the article text are cited in the reference list, and vice versa.
- Permission has been obtained for the use of any copyrighted material from other sources, including the Web.
- For open access articles, all authors understand that they are responsible for payment of the article publishing charge (APC) if the manuscript is accepted. Payment of the APC may be covered by the corresponding author's institution, or the research funder.

Author Information: It is important to ensure that the author details in the submission system are consistent with those in the manuscript, including affiliations, author order, and the designation of first and corresponding authors.

Submit online

Our online submission system guides you through the process steps of entering your manuscript 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 email.

Please follow this link to [submit your paper](#).

After receiving a final decision**Article Transfer Service**

If your manuscript is more suitable for an alternative journal published by Elsevier, you may receive an email asking you to consider transferring your manuscript via the [Elsevier Article Transfer Service](#).

The recommendation could come from the journal editor, a dedicated [in-house scientific managing editor](#), a tool-assisted recommendation or a combination.

If you agree with the recommendation, your manuscript will be transferred and independently reviewed by the editors of the new journal. You will have the opportunity to make revisions, if necessary, before the submission is complete at the destination journal.

Publishing agreement

Authors will be asked to complete a publishing agreement after acceptance. The corresponding author will receive a link to the online agreement by email. We advise you to read [Elsevier's policies related to copyright](#) to learn more about our copyright policies and your, and your employer's/institution's, additional rights for subscription and open access articles.

License options

Authors will be offered [open access user license options](#) which will determine how you, and third parties, can reuse your open access article. We advise that you review these options and any funding body license requirements before selecting a license option.

Open access

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

Permission for copyrighted works

If excerpts from other copyrighted works are included in your article, you must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) within your article using [Elsevier's permission request and license form](#).

Proof correction

To ensure a fast publication process we will ask you to provide proof corrections within two days.

Corresponding authors will be sent an email which includes a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to Word. You can edit text, comment on figures and tables and answer questions raised by our copy editor. Our web-based proofing service ensures a faster and less error-prone process.

You can choose to annotate and upload your edits on the PDF version of your article, if preferred. We will provide you with proofing instructions and available alternative proofing methods in our email.

Alt text for images and captions or audio descriptions for videos may have been added to improve accessibility. These have been independently provided by Elsevier and generated with the aid of AI, please check these in your proofs. You can find more information in this [alt text guide](#) and [Elsevier's page about improving accessibility](#).

The purpose of the proof is to check the typesetting, editing, completeness and correctness of your article text, tables and figures. Significant changes to your article at the proofing stage will only be considered with approval of the journal editor.

Offprints

A PDF file of your article will be sent by email to the corresponding author. The PDF file will be a watermarked version of your published article including a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

For an extra charge, you will be provided with the option to order paper offprints. A link to an offprint order form will be sent by email when your article is accepted for publication.

Responsible sharing

We encourage you to share and promote your article to give additional visibility to your work, enabling your paper to contribute to scientific progress and foster the exchange of scientific developments within your field. Read more about how to [responsibly share and promote your article](#).

Resources for authors

Elsevier Researcher Academy

If you would like help to improve your submission or navigate the publication process, support is available via [Elsevier Researcher Academy](#).

Elsevier Researcher Academy offers free e-learning modules, webinars, downloadable guides and research writing and peer review process resources.

Language and editing services

We recommend that you write in American or British English but not a combination of both.

If you feel the English language in your manuscript requires editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English, you may wish to use the [English Language Editing service](#) provided by Elsevier's Author Services.

Getting help and support

Author support

We recommend that you visit our [Journal Article Publishing Support Center](#) if you have questions about the editorial process or require technical support for your submission. Some useful links:

- [Five pre-submission tips](#)
- [How can I track the status of my submitted article?](#)
- [When will my article be published?](#)

ANEXO C - INSTRUÇÕES PARA AUTORES DA REVISTA EPIDEMIOLOGIA E SERVIÇOS DE SAÚDE

Instruções aos Autores

A Epidemiologia e Serviços de Saúde: revista do SUS (RESS) publica artigos científicos no campo da saúde coletiva, incluindo epidemiologia, ciências sociais e humanas na saúde, gestão e planejamento, e que apresentem evidências relevantes para o SUS

Tipos de documentos aceitos

A RESS acolhe manuscritos nas modalidades descritas abaixo. Os manuscritos devem ser submetidos em português e podem ter sido publicados como preprints, depositados em servidores confiáveis.

1. Artigo original – produto com dados não publicados de pesquisa. Essa modalidade inclui também relatos de experiência, investigação de eventos ou surtos e perfil de bases brasileiras.
2. Nota de pesquisa – relato conciso de resultados de pesquisa original.
3. Revisão – síntese da literatura científica, que pode ser sistemática, narrativa ou outros tipos de revisão.
4. Artigo de opinião – comentário sucinto sobre temas específicos no âmbito da saúde coletiva, a partir de evidências científicas e que expresse a opinião qualificada dos autores; deve ser elaborado por especialista, a convite dos editores.
5. Debate – artigo teórico elaborado por especialista, a convite dos editores, que receberá comentários e/ou críticas, por meio de réplicas, assinadas por especialistas, também convidados.
6. Carta – comentários e/ou críticas breves, vinculados a artigo publicado na revista, que poderão ser publicadas por decisão dos editores e acompanhadas por carta de resposta dos autores do artigo comentado.

7. Série metodológica – descrição de procedimentos metodológicos, incluindo métodos inovadores e aprimoramento de métodos existentes que sejam relevantes para o SUS, publicada em série de manuscritos, a convite dos editores.

8. Diretriz – guia ou diretriz para orientar condutas no âmbito do SUS.

As modalidades a convite e carta somente podem ser submetidas mediante convite emitido por meio do sistema ScholarOne, pois tais modalidades não ficam abertas no sistema. Em caso de dúvidas no processo de submissão, a secretaria da revista deve ser acionada.

Além das modalidades acima, submetidas pela comunidade científica, os editores são responsáveis pela elaboração de Editoriais (limite: 1.500 palavras) e Entrevistas (limite: 3.500 palavras) com personalidades ou autoridades. As características das modalidades acolhidas pela RESS estão sumarizadas abaixo. Em casos justificados e em manuscritos com citações restritas a artigos científicos, poderão ser aceitas referências acima do limite, a depender da decisão dos editores.

Características das modalidades acolhidas

Modalidade	Número de palavras	Número de tabelas e figuras	Número de referências	Resumo
Artigo original	3.500	Até 5	Até 30	Sim
Nota de pesquisa	1.500	Até 3	Até 20	Sim
Revisão	3.500	Até 5	Sem limite	Sim
Artigo de opinião	1.500	Até 3	Até 20	Não
Debate	3.500 (1.500 cada réplica ou tréplica)		Até 30	Não
Carta	400	Até 5	Até 5	Não
Série metodológica	1.500	Até 3	Até 20	Não

Diretriz	3.500	Até 5	Sem limite	Sim
----------	-------	-------	------------	-----

Contribuição dos autores

Os autores devem atender aos critérios de autoria em consonância com as deliberações do [ICMJE](#), a saber:

- Concepção ou delineamento do estudo, ou coleta, análise e interpretação dos dados;
- Redação ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual do manuscrito;
- Aprovação final da versão a ser publicada; e
- Responsabilidade por todos os aspectos do trabalho, incluindo a garantia de sua precisão e integridade.

Todos aqueles designados como autores devem atender aos quatro critérios de autoria. Demais casos devem ser reconhecidos nos **Agradecimentos**, com o termo de anuência a ser encaminhado no sistema de submissão.

A RESS adota o sistema de especificação Contributor Roles Taxonomy (CRediT, disponível em: <https://credit.niso.org>) que define 14 papéis ou funções de autoria:

Conceituação: Ideias; formulação ou evolução de metas e objetivos de pesquisa relevantes.

Curadoria de dados: Atividades de gerenciamento para comentar dados (produzir metadados), limpar dados e manter dados de pesquisa (incluindo código de software, onde for necessário, para interpretar os dados propriamente ditos) para uso inicial e posterior reutilização.

Análise formal: Aplicação de técnicas estatísticas, matemáticas, computacionais ou outras técnicas formais para analisar ou sintetizar dados de estudo.

Aquisição de financiamento: Aquisição do apoio financeiro para o projeto que deu origem a esta publicação.

Investigação: Condução de processo de pesquisa e investigação, especificamente realizando os experimentos, ou coleta de dados/evidências.

Metodologia: Desenvolvimento ou concepção de metodologia; criação de modelos.

Administração de projetos: Responsável pela gestão e coordenação do planeamento e execução da atividade de pesquisa.

Recursos: Fornecimento de materiais de estudo, reagentes, materiais, pacientes, amostras de laboratório, animais, instrumentação, recursos de computação ou outros instrumentos de análise.

Programas de computador: Programação, desenvolvimento de software; concepção de programas de computador; implementação do código de computador e algoritmos de suporte; teste de componentes de código existentes.

Supervisão: Responsabilidade de supervisão e liderança para o planeamento e execução da atividade de pesquisa, incluindo orientação para além da equipe principal.

Validação: Verificação, seja como parte da atividade ou separadamente, da replicação/reprodutibilidade geral dos resultados/experimentos e outros resultados de pesquisa.

Visualização: Preparação, criação e/ou apresentação do trabalho publicado, especificamente visualização/apresentação de dados.

Escrita – rascunho original: Preparação, criação e/ou apresentação do trabalho publicado, especificamente redação da versão inicial (incluindo tradução substantiva).

Escrita – revisão e edição: Preparação, criação e/ou apresentação do trabalho publicado por parte do grupo de pesquisa original, especificamente revisão crítica, comentário ou revisão – incluindo etapas de pré- ou pós-publicação.

Preparação do manuscrito

Após observar se a pesquisa se alinha ao escopo da RESS, os autores devem escolher a modalidade e adequar o manuscrito dentro da estrutura permitida.

Os manuscritos devem ser redigidos em língua portuguesa, em espaço simples, fonte Times New Roman 12, no formato DOC ou DOCX (documento do Word).

Na elaboração dos manuscritos, os autores devem orientar-se pelas Recomendações do [ICMJE](#).

Para permitir a **transparência do projeto e análise**, a estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as orientações constantes nos guias de redação científica, de acordo com o seu delineamento.

A relação completa dos guias encontra-se no site da *Enhancing the QUALity and Transparency Of health Research* ([EQUATOR](#)), disponível em: <http://www.equator-network.org/reporting-guidelines>). A seguir, são relacionados os principais guias pertinentes ao escopo da RESS.

- Estudos observacionais: *Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology* ([STROBE](#)), versões em [inglês](#) e [português](#) e suas [extensões](#);
- Revisões sistemáticas: *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA), versões em [inglês](#) e [português](#);
- Estudos de bases secundárias: *REporting of Studies Conducted using Observational Routinely-collected health Data* ([RECORD](#));
- Estimativas em saúde: *Guidelines for Accurate and Transparent Health Estimates Reporting* (GATHER), versões em [inglês](#) e [português](#).
- Ensaios clínicos: *CONsolidated Standards Of Reporting Trials* ([CONSORT](#)).

Demais delineamentos devem seguir o guia de redação recomendado pela rede [EQUATOR](#).

Formato de envio dos artigos

Os manuscritos devem ser submetidos à RESS por meio do [Sistema ScholarOne](#), em [documento único](#) contendo:

- Modalidade: identificar o tipo de manuscrito (ex.: artigo original, revisão);
- Título: informar o tema principal, delineamento, local e ano(s) da pesquisa, em consonância com o guia de redação aplicável. Títulos devem ser diretos, objetivos e sem siglas. A pontuação aceita no título são dois pontos (:), para indicar após o tema principal o delineamento, local e ano(s);

- Resumo: redigido em parágrafo único com até 250 palavras, e estruturado em: objetivo, métodos, resultados e conclusão;
- Palavras-chave: cinco, selecionadas a partir da lista Descritores em Ciências da Saúde (DeCS, disponível em: <https://decs.bvsalud.org/>), preferencialmente idênticas ao descritor principal DeCS. Em casos excepcionais poderão ser incluídos termos livres na ausência de termos apropriados à temática do estudo;
- Aspectos éticos: quadro contendo (i) o nome do comitê de ética em pesquisa que aprovou o estudo, (ii) número do parecer, (iii) data de aprovação, (iv) número do certificado de apresentação de apreciação ética, (v) registro de consentimento livre e esclarecido. Estudos sem apreciação ética devem justificar sucintamente o motivo.
- Corpo do manuscrito: estruturado em Introdução, Métodos, Resultados, Discussão para as modalidades Artigo original, Nota de pesquisa e Revisão. Demais modalidades podem ser ou não estruturadas, a critério dos autores e editores. **Para estruturar a redação de cada seção, os guias de redação de cada delineamento devem ser seguidos; recomenda-se que a seção de métodos inclua os tópicos indicados em cada guia, na ordem preconizada. Observar também as Orientações para preparação do texto, adiante;**
- Disponibilidade dos dados: o item é obrigatório e deve trazer a declaração sobre o acesso aos dados do manuscrito (banco de dados gerados pelos autores para análise, códigos, métodos e outros materiais resultantes da pesquisa objeto do manuscrito); deve-se informar o repositório e referenciamento, preferencialmente por meio de link do [SciELO Data](#), [OSF](#) ou outro que gere DOI, com a devida citação no texto para que o leitor possa obter esses dados. Caso os dados não possam ficar disponíveis, é necessário justificar;
- Registro do protocolo: para revisões sistemáticas e ensaios clínicos, fornecer nome do repositório e número de registro;

- Uso de inteligência artificial generativa: declarar o uso de tecnologias assistidas por inteligência artificial na elaboração do manuscrito e assegurar a acurácia nas citações e originalidade do conteúdo.
- Referências: seguir o formato [ICMJE](#) e [Manual de citações e referências na área da medicina](#) da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos (estilo Vancouver [Square Brackets], com DOI).
- Tabelas e figuras: observar o guia de redação do delineamento para priorizar as informações que devem ser apresentadas em tabelas e figuras. As ilustrações devem ser incluídas ao final do texto, após as referências, devem ser citadas no texto e enumeradas sequencialmente. As orientações constantes no tópico **Ativos digitais**, a seguir, devem ser observadas para construção das ilustrações.

Os seguintes dados deverão ser inseridos diretamente no sistema de submissão e não devem constar no manuscrito para permitir avaliação cega. Após aprovação, os dados serão extraídos diretamente do sistema, motivo pelo qual se orienta o cadastramento com atenção:

- Nome e ORCID iD;
- Afiliação;
- Créditos de autoria de acordo com o sistema de especificação CRediT;
- Financiamento;
- Agradecimentos (conforme Termo de anuência preenchido e assinado pelas pessoas a serem mencionadas);
- Conflito de interesses.

Ativos digitais

São aceitas tabelas e figuras, observando o limite da modalidade e as instruções abaixo. Poderão ser encaminhadas até duas tabelas e figuras suplementares em arquivo único, citadas no texto e em ordem sequencial, no formato: “Figura suplementar n”; “Tabela suplementar n”. O material suplementar deve seguir as mesmas instruções para elaboração de ilustrações, assegurando a precisão na sua preparação e revisão, pois tal recurso não é diagramado. Em casos

justificados, poderão ser aceitos tabelas ou figuras suplementares acima do limite, a depender da decisão dos editores.

Títulos de tabelas e figuras devem ser claros, informativos e apresentar o conteúdo da tabela ou figura. Informar o local, ano(s) e total de participantes incluídos na ilustração. Separar termos por vírgula e não incluir ponto no final dos títulos.

Títulos devem ser autossuficientes para a ilustração, dispensando consultar o texto. Siglas essenciais para compreensão da ilustração devem constar preferencialmente no título, conforme exemplo: “Tabela 3. Razões de prevalências (RP) brutas e ajustadas e intervalos de confiança de 95% (IC95%) do [desfecho] pelas variáveis do estudo. Local, ano (n=xx)”.

Não incluir detalhes metodológicos ou tipo de ilustração (ex.: gráfico de fluxo; mapa) no título das tabelas e figuras.

Os nomes das unidades federativas (UF) devem ser grafados por extenso. Não utilizar a palavra “município” antes do nome de cidades ou “estado” antes da UF, a exceção de cidades e estados com nomes idênticos (ex.: “município do Rio de Janeiro”, “estado de São Paulo”).

Notas de rodapé devem ser utilizadas para esclarecer resultado apresentado, identificadas por letras do alfabeto minúsculas e sobrescritas, em ordem sequencial e separadas por ponto e vírgula. A autoria das tabelas e figuras deve ser dos autores, dispensando tal indicação em nota de rodapé, semelhante à fonte dos dados e demais detalhes metodológicos, que devem constar nos métodos.

Tabelas

Apresente informações relevantes e suficientes; evite tabelas longas ou complexas. O título, a tabela e suas notas devem caber em duas páginas A4, no máximo, com margens mínimas de 1,5 cm, em modo retrato ou paisagem. A fonte padrão é Times New Roman, tamanho mínimo 10pt, com espaçamento simples. Utilize a opção “Repetir linhas de cabeçalho” do Word, sem quebrar manualmente as tabelas com duas páginas. Linhas e colunas de tabelas devem ser criadas com recurso de tabela, sem uso de espaço ou quebra de parágrafos.

Títulos e notas de rodapé devem ficar fora das linhas de grade das tabelas. Evite mesclar linhas ou colunas da tabela, o que impacta na diagramação. Utilize os mesmos termos do manuscrito nas colunas e linhas da tabela e mantenha o formato das tabelas idêntico ao apresentar a mesma informação de grupos ou análises diferentes. Verifique se o dado em cada célula é consistente entre colunas e linhas. Inclua colunas ou linhas com estatísticas descritivas ou inferenciais, medidas de associação e intervalos de confiança, quando apropriado. Apresente dados que se complementam em coluna única, como frequência absoluta e relativa: “| N (%) |” e medida de associação e de dispersão: “| RP (IC95%) |”. Evite colunas com recíproco de dado já apresentado (informação redundante), por exemplo: somente uma coluna com a distribuição absoluta e relativa da doença, sem necessidade de outra coluna com a distribuição entre saudáveis.

Mantenha a consistência ao alinhar dados, símbolos e texto. Crie cabeçalhos curtos, autoexplicativos e com unidade de medida, se aplicável. Todos os dados das células devem ter a mesma natureza do que foi informado no cabeçalho da tabela. Não é permitido, por exemplo, em uma tabela cujo cabeçalho informa contagens, incluir média e desvio padrão. Especifique as estatísticas relatadas nos cabeçalhos (ex.: “Média±DP”, “Mediana (IIQ)”, “n (%)”) e informe as unidades de medida nas colunas, quando aplicável, sem repetir as unidades em cada célula (ex.: %). Informe a unidade na linha da variável (ex.: “Renda (salários mínimos)”); “Faixa etária (anos)”) e remova repetições nas categorias da variável. Utilize hífen (“-”) para intervalos numéricos das categorias (ex.: 0-4) e assegure compatibilidade entre as categorizações apresentadas nas tabelas e aquelas informadas nos métodos, com consistência em todo o texto. Variáveis ou categorias de referência nas investigações de associações devem ser indicadas na célula da tabela por “1,00”.

A organização dos dados é uma boa prática. Alinhe os dados numéricos à direita e os de texto à esquerda nas células. Organize linhas e colunas de forma lógica e intuitiva, aplicando hierarquia para organizar as variáveis. Agrupe variáveis

semelhantes e ordene colunas e linhas de forma lógica (ex.: ordem alfabética, cronológica, crescente ou decrescente).

A precisão dos dados também é importante. Apresente-os com o número correto de dígitos significativos (observar padrão de casas decimais nas **Orientações para preparação do texto**, adiante), agrupando variáveis categóricas conforme pertinente à distribuição para evitar excesso de linhas. Dê preferência à mediana e quartis para descrever variáveis contínuas, exceto para dados normalmente distribuídos. Colunas ou linhas com valores constantes, sem variação, devem ser excluídas e informadas diretamente no texto (ex.: “Todas as participantes foram consultadas por médico no último ano”). Em amostras inferiores a 100, apresente somente números absolutos, sem porcentagens.

Revise a tabela cuidadosamente para garantir a clareza, consistência e adequação da formatação. Mantenha a formatação e a apresentação dos dados coerentes, preferencialmente na mesma ordem de apresentação das variáveis, em todas as tabelas do manuscrito. Assegure que os dados apresentados na tabela são relevantes; nem todos os dados disponíveis na saída (*output*) do programa estatístico são pertinentes a uma tabela de artigo científico. A consulta de manuscritos prévios que empregaram abordagem analítica semelhante é recomendável.

Figuras

Certifique-se de que todas as imagens, gráficos, figuras e mapas sejam nítidos, legíveis, inclusive seu texto, tenham escalas compatíveis e sejam de alta qualidade, com legibilidade e tamanho de fonte adequados para publicação. Não faça *prints* ou transforme materiais gráficos ou vetoriais em imagem. Figuras compostas por formas (ex.: fluxogramas, ciclos, processos etc.) devem ser enviadas como elementos do Word, com texto editável e sem converter à imagem. Recomenda-se não incluir fotos como figuras, mas sim materiais gráficos com resultados da pesquisa, conforme pertinente. No caso de o artigo conter fotografias com pessoas, é necessário que os autores apresentem declaração de cessação de direitos de imagem e assegurem a impossibilidade de identificação de pessoas na imagem.

Em caso de aceite, as figuras devem ser encaminhadas em arquivos separados para diagramação. Gráficos, mapas e demais figuras devem ser enviados no formato PDF, SVG e EPS, exportadas em um dos formatos diretamente do software utilizado na sua criação. Gráficos criados em Excel podem ser enviados no formato XLSX. Em caso de fotos, a resolução mínima é de 300 dpi, no formato JPEG. O título, a figura e sua legenda devem caber em uma página A4, no máximo, em modo retrato ou paisagem, com margens de 1,5 cm em todos os lados.

Todos os símbolos, setas, números ou letras usados nas figuras devem ser identificados e explicados claramente na legenda, que deve ser concisa e com detalhes suficientes para a compreensão da figura. Siglas e abreviações devem ser explicadas preferencialmente no título da figura.

Para figuras compostas (mosaicos), identifique cada parte com letras maiúsculas e descreva-as na legenda, em texto completo de sentido (ex.: “Consumo de medicamentos em homens (A) e mulheres (B)”). Preferencialmente empregue a mesma escala nas figuras que compõem o mosaico. Minimize o número de elementos dentro do campo de dados e certifique-se de que todos estejam claramente identificados.

Identifique cada eixo claramente com o nome da variável, as unidades em que a variável é plotada e quaisquer multiplicadores associados às unidades. Indique claramente o ponto zero dos eixos X e Y do gráfico, especialmente se um ou ambos os eixos não começarem em zero. Organize as escalas para que os valores do eixo Y aumentem de baixo para cima e os valores do eixo X da esquerda para a direita. Ajuste as escalas para maximizar o uso do campo de dados. Inclua apenas divisões e rótulos essenciais, lógicos e geralmente equidistantes nas escalas. Minimize as divisões desnecessárias e as marcas de escala sem rótulo.

Evite usar apresentações 3D, a menos que uma terceira dimensão seja essencial para a representação dos dados. Ao interpretar gráficos com dois eixos verticais diferentes, observe claramente as diferentes escalas e destaque se as diferenças ou semelhanças visuais refletem com precisão as relações entre os dados.

Certifique-se de que os dados sejam visualmente distintos e claramente identificáveis.

Ao inserir mapas, apresente a escala com a relação entre as distâncias no mapa e as distâncias reais e orientação cartográfica, inclua a indicação do Norte (N) e legenda com todos os símbolos, cores e informações representadas. Utilize gradiente de cor padronizado para indicar densidade em todos os mapas do manuscrito, evitando induzir erros ao mudar o significado de cores a cada mapa. Caso sejam incluídos mosaicos de mapas, apresente legenda única, comum a todos os mapas.

Orientações para preparação do texto

Como revista do SUS, a RESS reconhece a importância da clareza e precisão na comunicação científica. O texto deve ser livre de termos estigmatizantes ou despersonalizantes; adotar terminologia adequada e atual, com emprego de termos como “pessoas escravizadas” ao invés de “escravos”, ou “pessoas com obesidade” ao invés de “obesos”.

Estrangeirismos, mesmo que usuais, devem ser evitados, optando por termo no vernáculo (ex.: empregue “dados faltantes” ao invés de “*missing*”; e “pareamento [determinístico ou probabilístico] dos dados” ao invés de “*linkage*”).

Priorize frases curtas e diretas, com apenas uma ideia principal em cada uma. Limite o uso de apostos: explique termos complexos com objetividade, sem excesso de informações entre vírgulas. Se a frase ocupar muitas linhas, revise-a e busque maneiras de torná-la mais concisa: divida em frases menores ou elimine palavras desnecessárias.

Evite construções complexas, hiperbólica ou exageros – evidencie a relevância por meio de dados factuais e remova advérbios e adjetivos. Remova artigos indefinidos para indicar situações definidas (ex.: “um aumento”, “uma diminuição”).

As sentenças devem ter sentido completo, com emprego de conector textual adequado (preposição, conjunção etc.) ao invés de símbolos ou pontuações. Não usar texto telegráfico ou tentar induzir sentido: apresentar construções com uso de palavras para traduzir o sentido desejado.

Opte por voz ativa e declarações diretas e positivas em vez de voz passiva e construções negativas ou indiretas (ex.: empregue "é comum" em vez de "não é incomum"; ou "é permitido" em vez de "não é proibido"). Esforce-se para uma comunicação clara que transmita informações compreensíveis.

Seja particularmente cuidadoso com a denominação das variáveis. Utilize terminologia adequada ao padrão técnico-científico e dentro da norma culta. Desfechos negativos requerem especial atenção: denominar uma variável como "negligência no exame do pé" seria mais adequado do que as opções "não teve o pé examinado" ou "nenhum exame do pé". A clareza e simplicidade da comunicação devem nortear a padronização adotada.

Certifique-se de que a estrutura da frase faça sentido lógico semanticamente, evitando construções inconsistentes ou paradoxais, como "presença de ausência" (ex.: optar por "a negligência foi maior em idosos" ao invés de "a presença de negligência foi maior em idosos").

As ideias devem fluir de forma lógica e sequencial ao longo dos parágrafos, com coesão textual. Conjunções de início de frase que pretendem trazer essa conexão devem ser evitadas, como por exemplo, "Além de", "No entanto", "Nesse sentido", "No que se refere à", "Contudo".

Na apresentação ou discussão dos resultados, evite anunciar o tema no início da frase. Vá direto ao ponto: prefira "As mulheres foram maioria" a "Em relação ao sexo, as mulheres foram maioria". Evite uso de "respectivo" ou "respectivamente", seja na comparação com a literatura ou apresentação de resultados – trazer os dados para próximo da sua correspondência, o que torna o texto mais claro para os leitores.

No texto dos resultados, não faça inferências, interpretações ou comparações com a literatura. Tanto no texto completo quanto no resumo, cada afirmação apresentada nos resultados deve ser acompanhada por dado numérico que a apoie, indicando a ilustração pertinente. Apresentar resultados exatos e não aproximados, sem uso de construções como "cerca de", "aproximadamente" etc. Evite texto pouco específico como "foi associado" ou "encontrou-se associação", informar a direção da associação por meio de texto informativo, como "o desfecho

foi maior em crianças”, apresentando imediatamente a medida de associação e intervalo de confiança, sem interpretações como “foi duas vezes maior”.

Nas seções de revisão de literatura (introdução e discussão), o foco deve ser os dados científicos. Evitar destacar organismos, autores ou nomes de relatórios, cujas informações encontram-se nas referências. Construções como “outros autores”, “outros estudos”, “a literatura aponta” etc. devem ser evitadas: apresentar o dado com clareza e citar a referência próximo à afirmação. Afirmações categóricas sobre ausência de estudos prévios devem ser evitadas em delineamentos que não sejam revisões sistemáticas da literatura.

Siglas ou acrônimos só devem ser empregados se forem consagrados na literatura e em casos que o uso contribui para clareza da comunicação. Mesmo se tratando de jargão da área, os autores devem dar preferência por expressões que comuniquem com clareza e objetividade ao leitor de qualquer área. O texto deve ser livre de termos compostos que não adicionam informação (ex.: “diabetes mellitus” ao invés de “diabetes”, “hipertensão arterial sistêmica” ao invés de “hipertensão”), minimizando necessidade de siglas. Siglas para substituir termos únicos (ex.: “TB” ao invés de “tuberculose”) igualmente devem ser excluídas, bem como as siglas não utilizadas ou pouco frequentes no texto. As siglas indispensáveis ao texto devem ser explicadas na primeira menção no resumo, texto completo e cada tabela ou figura (preferencialmente no título), por meio do termo por extenso, seguido da sigla entre parênteses.

Para indicar a sigla de razão de chances, o seguinte padrão deve ser empregado: “razão de chances (*odds ratio*, OR)”. A medida de associação de tempo para evento *hazard ratio* deve ser grafada em inglês e em itálico, com indicação na primeira menção da seguinte forma: “*hazard ratio* (HR)”.

As regras de ortografia devem ser seguidas na construção do texto: o uso de maiúsculas somente deve ocorrer em casos previstos na língua portuguesa, como início de frases, cidades, países etc. Caso haja necessidade de utilizar parênteses dentro de trecho entre parênteses, deve ser empregados colchetes, conforme exemplo: “(negros [pretos e pardos])”.

Utilizar ponto como separador de milhar e vírgula para frações. Padronizar o número de casas decimais nos métodos, resultado e ilustrações: percentual 1 casa decimal, medida de associação: 2 casas decimais, p-valor: 3 casas decimais; apresentar p-valor exato com 3 casas decimais; ocorrências “0,000” devem ser grafadas como “<0,001”. Na introdução e na discussão, por se tratar de comparação com dados externos à pesquisa, apresentar dados sem casas decimais, preferencialmente.

Não incluir espaço antes e após sinais (=, <, >, ≤, ≥ etc.). Apresentar medidas de frequência ou associação e de dispersão no padrão: indicar a sigla da medida sem sinal de igual ou dois pontos, com espaço entre a sigla e o número: “RP 1,52”. Separar intervalos por ponto e vírgula, e com espaço entre a pontuação e numeral subsequente: “(IC95% 1,14; 2,23)”. Caso ambas as medidas sejam apresentadas entre parênteses, incluir ponto e vírgula para separar as medidas: “(RP 1,52; IC95% 1,14; 2,23)”.

Citações e referências

A RESS segue o estilo Vancouver [Square Brackets], com DOI (formato [ICMJE](#) e [Manual de citações e referências na área da medicina](#) da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos) para formatação e citação das referências no manuscrito, na qual:

As referências devem ser citadas em sistema numérico, segundo a ordem de citação no texto, com os números entre colchetes, imediatamente após a passagem do texto em que é feita a citação, e antes da pontuação do texto, separados entre si por vírgulas; se números sequenciais, separados por hífen, enumerando apenas a primeira e a última referência do intervalo sequencial de citação; exemplo: [7,10-16]. A lista de referências deve conter todas as referências listadas na ordem de citação no texto.

Para referência com mais de seis autores, listar os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al.” para os demais. Títulos de periódicos deverão ser grafados de forma abreviada, de acordo com o estilo usado no [Index Medicus](#) ou

no [Portal de Revistas Científicas de Saúde](#). Títulos de livros e nomes de editoras deverão constar por extenso.

Recomenda-se fortemente o uso de gerenciador de referências bibliográficas, como EndNote, Mendeley e Zotero, o que minimiza erros de referência e facilita o processo de ajuste do manuscrito pelos autores, etapa em que inserções e exclusões de referências são usuais e podem inserir erros no manuscrito caso sejam realizados manualmente. O estilo Vancouver está disponível em todos esses softwares.

O formato para citar artigos científicos segue o padrão:

Autor(es). Título. Nome abreviado do periódico. Ano;Volume(Número):Página. (com a página final abreviada [ex.: 123-5] ou página eletrônica [e-page]). Link do DOI

Abaixo seguem exemplos de tipos de documentos na norma.

Artigo científico

Com número de página inicial e final

Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. J Sci Commun 2020;163:51-9. <https://doi.org/10.1016/j.sc.2020.00372>.

Com número de artigo (epage)

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

Livro

Billoski TV. Introduction to Paleontology. 6th ed. New York: Institutional Press; 1992. 212 p.

Capítulo de livro

Schwartz MT, Billoski TV. Greenhouse hypothesis: effect on dinosaur extinction. In: Jones BT, Lovecraft NV, editors. Extinction. New York: Barnes and Ellis; 1990. p. 175-89.

Site

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <https://www.nap.edu/catalog/10149/improving-palliative-care-for-cancer>.

Banco de dados

Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne A, Shearer FM, Brady OJ et. al. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence [dataset]. 2015 Jun 30 [cited 2015 Oct 23]. Dryad Digital Repository. Available from: <https://datadryad.org/stash/dataset/doi:10.5061/dryad.47v3c> Referenced in doi: 10.7554/eLife.08347

Além de observar o estilo de citação e referenciamento, os autores devem observar critérios para seleção das referências. As referências citadas indicam atualização e conexão com investigações relevantes dos autores e seu texto. **Recomenda-se citar pesquisas científicas relevantes (metodologicamente bem conduzidas, que foram avaliadas na íntegra pelos autores), atualizadas (até 5 anos), e acessíveis (artigos publicados em periódicos indexados, evitar sites e relatórios que podem se tornar indisponíveis).**

A boa prática na revisão da literatura e construção do texto veta a prática de citação de citação (*apud*), que frequentemente ocorre ao citar informações presentes na introdução ou discussão da publicação. Tal procedimento configura citação indireta e introduz erros factuais no texto.

Documentos suplementares

Na submissão do manuscrito, os autores devem encaminhar os seguintes arquivos pelo [Sistema ScholarOne](#):

1. [Formulário de Conformidade com a Ciência Aberta](#), que deve ser enviado como arquivo destinado à revisão/“file FOR review”.
2. [Termo de anuência](#) das pessoas que serão citadas em agradecimentos, que deve ser enviado como arquivo não destinado à revisão “file NOT for review”.

Declaração de financiamento

Informar fontes de apoio para o trabalho, incluindo nomes de patrocinadores e, número de processo no sistema ScholarOne.

Fornecedores de materiais, equipamentos, insumos ou medicamentos, gratuitos ou com descontos, também devem ser descritos como fontes de financiamento, incluindo-se cidade, estado e país de origem desses fornecedores.

Informações adicionais

A celeridade na divulgação científica é um princípio ético e de integridade em pesquisa respeitado pela RESS. Todas as atividades editoriais são orientadas por tais princípios – inclusive as presentes instruções –, com objetivo de aprimorar o manuscrito candidato à publicação em tempo de processamento que favoreça os autores e o esforço empreendido na submissão.

Contribuições da comunidade são acolhidas por meio do e-mail revista.svs@saude.gov.br, onde podem ser encaminhadas críticas, sugestões de aprimoramento e elogios.

Após a aprovação, o manuscrito segue para a produção editorial, constituída das seguintes etapas:

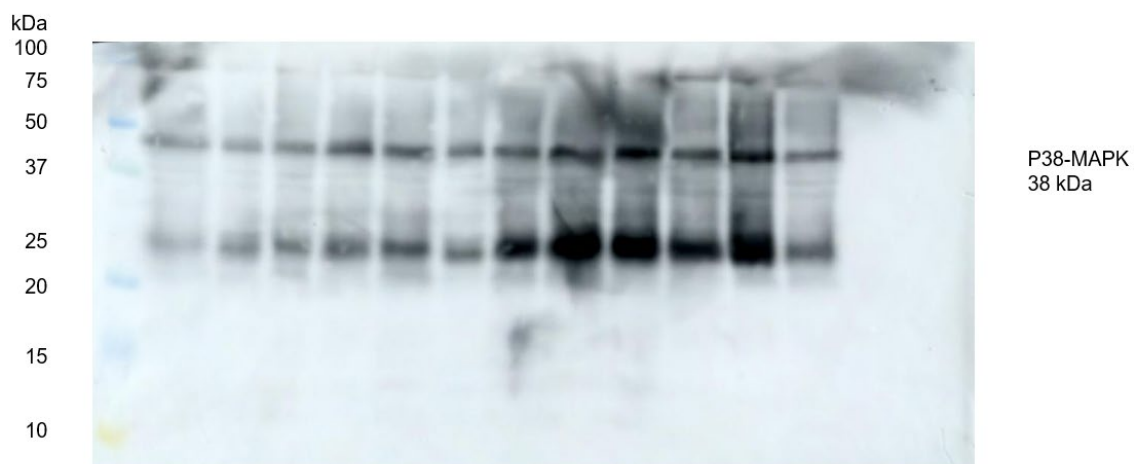
- 1) Revisão de linguagem: revisão e edição para clareza, gramática e estilo;
- 2) Normalização das referências bibliográficas;
- 3) Tradução do texto completo do manuscrito para o inglês e do resumo para espanhol;
- 4) Diagramação do texto, tabelas e figuras;
- 5) Revisão final;
- 6) Controle de qualidade;
- 7) Prova do prelo, encaminhada ao autor principal por e-mail, em formato PDF, para revisão e aprovação final para publicação do manuscrito; e
- 8) Editoração (marcação em XML) e publicação eletrônica.

Os autores poderão entrar em contato com a secretaria executiva da RESS por meio dos contatos abaixo, em caso de dúvidas sobre as instruções ou solicitação de informação sobre o andamento do manuscrito, que fica também disponível no [Sistema ScholarOne](#).

APÊNDICE A - SUPPLEMENTARY FIGURES S1, S2 AND S3

UNCROPPED ORIGINAL WESTERN BLOT MEMBRANES

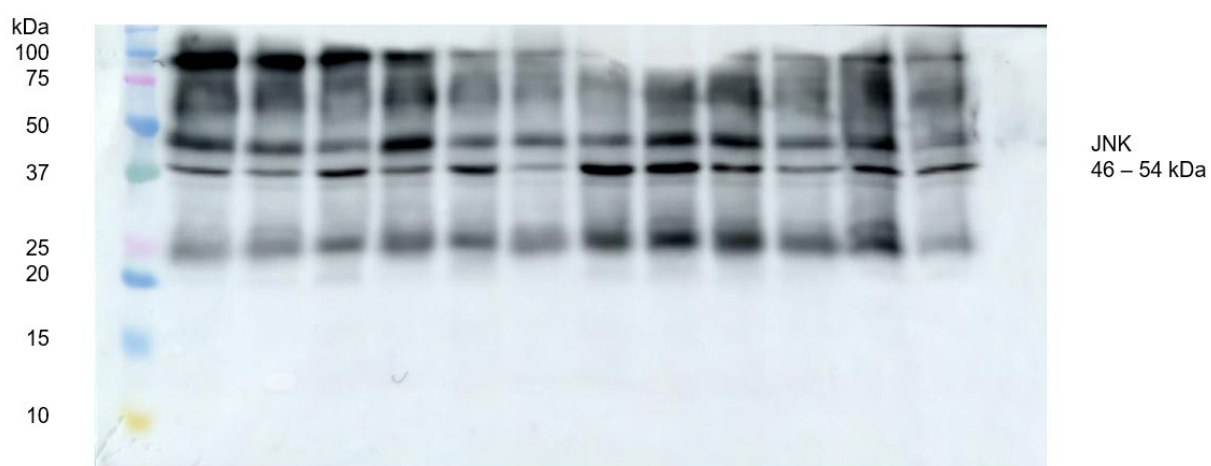
Supplementary Figure S1. Uncropped original western blot membrane used for p38-MAPK quantification



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
C L C L C L C L C L C L

(C: Control, L: LDX)

Supplementary Figure S2. Uncropped original western blot membrane used for JNK quantification



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
C L C L C L C L C L C L

(C: Control, L: LDX)

Supplementary Figure S3. Uncropped original western blot membrane used for ERK quantification