



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

MICHEL FERNANDO BENTO DA SILVA

**DIMENSÃO FRACTAL DE FERIDAS DÉRMICAS TRATADAS COM FIBRINA RICA
EM PLAQUETAS AUTÓLOGA E ROSUVASTATINA EM COELHOS**



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

MICHEL FERNANDO BENTO DA SILVA

**DIMENSÃO FRACTAL DE FERIDAS DÉRMICAS TRATADAS COM FIBRINA RICA
EM PLAQUETAS AUTÓLOGA E ROSUVASTATINA EM COELHOS**

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

Orientadora:
Profa. Dra. Cecília Laposy Santarém

636.089
S586d

Silva, Michel Fernando Bento da.

Dimensão fractal de feridas dérmicas tratadas com fibrina rica em plaquetas autóloga e rosuvastatina em coelhos / Michel Fernando Bento da Silva. – Presidente Prudente, 2020.

46f.: il.

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

Bibliografia.

Orientadora: Cecília Laposy Santarém

1. Rosuvastatina. 2. Dimensão Fractal. 3. Fibrina Rica em Plaquetas autóloga. I. Santarém, Cecília Laposy. II. Título.

MICHEL FERNANDO BENTO DA SILVA

**DIMENSÃO FRACTAL DE FERIDAS DÉRMICAS TRATADAS COM FIBRINA RICA
EM PLAQUETAS AUTÓLOGA E ROSUVASTATINA EM COELHOS**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre- Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Presidente Prudente, 14 de julho de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cecília Laposy Santarém
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Guilherme Akio Tamura Ozaki
Universidade Paulista-UNIP
Araçatuba-SP

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa Nayara Nardin Teixeira, por todo amor, incentivo, apoio e compreensão, por suportar todos os momentos difíceis ao meu lado, a sua presença foi essencial para a conclusão deste trabalho. Te amo.

À minha mãe, Sonia Aparecida Tino. Obrigado por ser a melhor mãe que alguém poderia desejar. Serei eternamente grato por cada colo, por cada sorriso e por cada palavra gentil, você é fonte de inspiração para mim.

Ao meu pai, Mario Bento da Silva (*in memoriam*) que me ensinou valores importantes para toda a vida. Sua lembrança me inspira e me faz persistir.

À minha irmã Maiara Aparecida Tino e ao meu cunhado Vinicius Silva, que me apoiaram de diversas maneiras nessa etapa tão importante da minha vida.

Aos meus avós maternos, Lourenço Tino e Inês Mendes de Oliveira Tino, e paternos, Antônio Bento da Silva (*in memoriam*) e Maria Alves da Silva (*in memoriam*), que sempre serão grandes exemplos de dignidade e caráter para mim.

A minha orientadora, Prof^a Cecília Laposy Santarém, por compartilhar todo seu conhecimento científico para realização desse sonho. Sua dedicação e paciência serviram como pilares de sustentação para a conclusão deste trabalho.

E também a todos os professores que participaram da minha jornada, agregando sabedoria e conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo acontecesse na minha vida, nem antes nem depois, mas no exato momento em que deveria acontecer.

A minha querida família, cuja presença é essencial em minha vida, pelo carinho, estímulo e, principalmente, por compreenderem minha ausência em tantos momentos. Sem vocês eu nada seria, e nada disso faria sentido.

A todos os amigos da Pós-Graduação do Mestrado em Ciência animal, em especial ao amigo Cristoffer Santana e a amiga Thaynara Zanoni D'Almeida que sempre estiveram ao meu lado compartilhando suas experiências de forma construtiva. Gratidão.

A Yuri Ferreira Vicentin, discente do Curso de Medicina Veterinária da Unoeste, pela disponibilidade e colaboração inestimável.

A todos os Docentes, por serem uma constante fonte de motivação e incentivo ao longo de todo curso, em especial as Professoras Doutoras: Gisele Alborghetti Nai, Renata Navarro Cassu, Rosa Maria Barilli Nogueira, pela incansável contribuição e imensa colaboração, imprescindíveis para realização desta pesquisa.

A minha orientadora Cecília Laposy Santarém, por ter confiado em mim, pelas valiosas e incontáveis horas dedicadas ao projeto, sempre com uma presença cheia de otimismo. Grato por tudo.

A Unoeste por me abrir as portas, e por toda equipe que nela trabalha, por proporcionar que tudo isso tenha acontecido.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
Marthin Luther King

RESUMO

Dimensão fractal de feridas dérmicas tratadas com fibrina rica em plaquetas autóloga e rosuvastatina em coelhos

A cicatrização de feridas é um processo complexo dividido em eventos biológicos e separados em quatro estágios: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. O uso de biomateriais como a fibrina rica em plaquetas (FRP) nas condutas atuais para melhorar a regeneração tecidual está diretamente relacionado à diminuição do tempo de tratamento, melhora da qualidade da cicatriz e redução do risco de rejeição. O uso de estatinas tem se mostrado eficaz no tratamento de dermatopatias. Este efeito pleiotrópico sugere que as estatinas possam modular processos celulares como inflamação, apoptose e proliferação. A dimensão fractal (DF) é uma ferramenta de análise que permite mensuração com mais precisão quando comparada aos métodos histológicos convencionais. Este estudo teve por objetivo utilizar a DF para avaliar as fibras colágenas de feridas dérmicas tratadas com fibrina rica em plaquetas autóloga (FRPa) associadas ou não a rosuvastatina (RSV). Foram utilizados 08 coelhos adultos, machos, da raça Nova Zelândia. Em cada coelho foram feitas quatro incisões equidistantes na região dorsal. Cada ferida recebeu um tipo de tratamento: solução fisiológica, FRPa, RSV e FRPa+RSV. A pele íntegra, retirada no momento da incisão, foi avaliada para comparação com os diferentes tratamentos. As amostras dérmicas foram coradas por Tricomico de Masson e Picosirius. O resultado da análise da DF das amostras coradas com Picosirius na pele íntegra foi menor ($1,86 \pm 0,06$) quando comparado aos diferentes tratamentos ao 17^o dia (controle $1,92 \pm 0,02$; FRPa $1,93 \pm 0,01$; RSV $1,93 \pm 0,02$; FRPa+RSV $1,92 \pm 0,01$) indicando uma maior concentração e organização das fibras colágenas. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados. Com base nos resultados, concluímos que a DF mostrou-se eficiente para a avaliação do colágeno e pode ser uma ferramenta auxiliar na avaliação dos achados histológicos.

Palavras-chave: Dimensão fractal, biomateriais, cicatrização, estatinas.

ABSTRACT

Fractal dimension of dermal wounds treated with autologous platelet-rich fibrin and rosuvastatin in rabbits

Wound healing is a complex process divided into biological events and separated into four stages: hemostasis, inflammation, proliferation and remodeling. The use of biomaterials such as platelet-rich fibrin (FRP) in current procedures to improve tissue regeneration is directly related to reducing treatment time, improving scar quality and reducing the risk of rejection. The use of statins has been shown to be effective in the treatment of skin diseases. This pleiotropic effect suggests that statins can modulate cellular processes such as inflammation, apoptosis and proliferation. The fractal dimension (DF) is an analysis tool that allows more accurate measurement when compared to conventional histological methods. This study aimed to use DF to evaluate the collagen fibers of dermal wounds treated with autologous platelet-rich fibrin (aFRP) associated or not with rosuvastatin (RSV). Eight adult New Zealand male rabbits were used. In each rabbit, four equidistant incisions were made in the dorsal region. Each wound received a type of treatment: saline, aFRP, RSV and aFRP + RSV. The intact skin, removed at the time of the incision, was evaluated for comparison with the different treatments. Dermal samples were stained by Masson's trichrome and Picrosirius. The result of the DF analysis of the samples stained with Picrosirius in intact skin was lower (1.86 ± 0.06) when compared to the different treatments at 17° days (control 1.92 ± 0.02 ; aFRP 1.93 ± 0.01 ; RSV 1.93 ± 0.02 ; aFRP + RSV 1.92 ± 0.01) indicating a greater concentration and organization of collagen fibers. There was no statistical difference between the treated groups. Based on the results, we concluded that DF was efficient for the evaluation of collagen, especially in slides stained with Picrosirius and can be an auxiliary tool in the evaluation of histological findings.

Keywords: Fractal dimension, biomaterials, wound healing, statins.

LISTA DE SIGLAS

°C	– Graus Celsius
DF	– Dimensão Fractal
EGF	– Fator de Crescimento Epidérmico
FRP	– Fibrina Rica em Plaquetas
FRPa	- Fibrina Rica em Plaquetas autóloga
IGF	– Fator do Crescimento Semelhante a Insulina
IM	– Intramuscular
Kg	– Quilograma
Mg	– Miligrama
ML	– Mililitros
MM	– Milímetros
PDGF	– Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PRP	– Plasma Rico em Plaquetas
RSV	– Rosuvastatina Cálcica
TGF- β	– Fator de Transformação do Crescimento Beta
TM	– Tricrômico de Masson
VEGF	– Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	11
	ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE USO DE ANIMAIS	
	(CEUA).....	33
	ANEXO B - NORMAS DE PUBLICAÇÃO.....	34

Artigo¹

Dimensão fractal de feridas dérmicas tratadas com fibrina rica em plaquetas autóloga e Rosuvastatina em coelhos

Michel Fernando Bento da Silva^a, Yuri Ferreira Vicentini^b, Gisele Alborghetti Nai^c, Rosa Maria Barilli Nogueira^c, Cecília Laposy Santarém^{c*}

^aDiscente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil.

^bDiscente do Curso de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista, Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil

^cProfessores Doutores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil.* E-mail: claposy@unoeste.br

Título abreviado: DF de feridas dérmicas tratadas com FRP autóloga e RSV em coelhos

Palavras-chave: 1. Coelhos 2. Dimensão Fractal 3. Cicatrização 4. Colágeno 5. Concentrados plaquetários 6. Estatinas 7. Histologia

Highlights:

- Fármacos hipolipemiantes auxiliam a cicatrização de feridas cutâneas.
- A FRPa promove melhor rearranjo das fibras colágenas
- Qto maior DF melhor é a organização das fibras colágenas em feridas dérmicas.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo número 2016/25938-0)

Endereço para correspondência:

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Rodovia Raposo Tavares, Km 572, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Tel: +55 (18) 99623-0772;

Fax: +55 (18) 3229-2080;

E-mail: claposy@unoeste.br

Conflito de interesses: Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Artigo elaborado segundo normas da revista Biochemical and Biophysical Research Communications.

Resumo

A cicatrização de feridas é um processo complexo dividido em eventos biológicos e separados em quatro estágios: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. O uso de biomateriais como a fibrina rica em plaquetas autóloga (FRPa) para melhorar a regeneração tecidual está diretamente relacionado à diminuição do tempo de tratamento, melhora da qualidade da cicatriz e redução do risco de rejeição. O uso de fármacos hipolipemiantes como as estatinas tem se mostrado eficaz no tratamento de dermatopatias. Este efeito pleiotrópico sugere que as estatinas possam modular processos celulares como inflamação, apoptose e proliferação. A dimensão fractal (DF) é uma ferramenta de análise que permite mensuração com mais precisão quando comparada aos métodos histológicos convencionais. Este estudo teve por objetivo utilizar a DF para avaliar as fibras colágenas de feridas dérmicas tratadas com fibrina rica em plaquetas autólogas associadas ou não a rosuvastatina (RSV). Foram utilizados 08 coelhos adultos, machos, da raça Nova Zelândia. Em cada coelho foram feitas quatro incisões equidistantes na região dorsal. Cada ferida recebeu um tipo de tratamento: solução fisiológica, FRPa, RSV e FRPa+RSV. A pele íntegra, retirada no momento da incisão, foi avaliada para comparação com os diferentes tratamentos. As amostras dérmicas foram coradas por tricrômico de Masson e Picrosirius. O resultado da análise da DF das amostras coradas com Picrosirius na pele íntegra foi menor ($1,86 \pm 0,06$) quando comparado aos diferentes tratamentos ao 17º dia (controle $1,92 \pm 0,02$; FRP $1,93 \pm 0,01$; RSV $1,93 \pm 0,02$; FRP+RSV $1,92 \pm 0,01$) indicando uma maior concentração e organização das fibras colágenas. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados. Com base nos resultados, concluímos que a DF mostrou-se eficiente para a avaliação do colágeno, especialmente nas lâminas coradas com Picrosirius e pode ser uma ferramenta auxiliar na avaliação dos achados histológicos.

Palavras-chave: Dimensão fractal, biomateriais, cicatrização, estatinas.

1.Introdução

A pele é o maior órgão do corpo humano e desempenha um papel importante na manutenção contínua da vida [1]. A cicatrização de feridas é um processo complexo dividido em eventos biológicos e separados em quatro fases ou estágios, sendo elas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação [2]. Quando se tem uma lesão, as plaquetas secretam vários fatores de crescimento e estimulam a cascata de coagulação para formação do coágulo [3]. Entre os grandes desafios enfrentados pela pesquisa clínica está o desenvolvimento de aditivos cirúrgicos bioativos que regulem a inflamação e promovam a cura [4]. Os biomateriais vêm sendo utilizados para estes fins, pois agem na promoção da cicatrização de maneira mais homogênea, com melhor distribuição do colágeno [5].

Os concentrados de plaquetas são biomateriais que vêm sendo usados na medicina regenerativa há décadas. Inicialmente desenvolvidos com adição de anticoagulantes, para que fosse prevenida a rápida coagulação sanguínea antes da centrifugação, recebeu o nome de plasma rico em plaquetas (PRP), porém mais tarde, preocupações foram levantadas quanto ao uso de anticoagulantes, que demonstraram ter impactos negativos na cicatrização e na prevenção de coágulos. Por essa razão pesquisas com intuito de utilizar o concentrado de plaquetas sem a incorporação do anticoagulante foram iniciadas, e esta nova preparação recebeu o nome de fibrina rica em plaquetas (FRP) [6].

Este biomaterial contém grandes quantidades de plaquetas e leucócitos, e uma matriz de fibrina autóloga que é rica em fatores de crescimento, tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), fator do crescimento semelhante a insulina (IGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), favorecendo a cicatrização de feridas [7]. Inicialmente desenvolvido para uso específico de procedimentos cirúrgicos oral e maxilofacial [8], a FRP representou um novo conceito em géis de plaquetas e com a sua facilidade clínica de uso e

manuseio, a composição bioquímica dos subprodutos da FRP fornecem componentes favoráveis para serem utilizados em situações que necessitam do procedimento cicatricial [9]. Além do uso de biomateriais, estudos demonstram que medicamentos hipolipemiantes como as estatinas estão sendo utilizados como adjuvantes na cicatrização de feridas [10]. Observou-se que esta família de medicamentos apresentam efeitos benéficos na redução da carga bacteriana, melhoram a epitelização e exercem efeitos diretos sobre microrganismos patogênicos e fungos [10]. Quando comparada as estatinas, a Rosuvastatina (RSV) é considerada a mais potente, a sua duração de ação e meia vida plasmática são maiores do que qualquer outro medicamento dessa classe [11].

O colágeno é o principal componente da matriz extracelular, e desempenha um papel estrutural importante na resistência e elasticidade da pele, sendo responsável pela reestruturação e função da mesma [12]. Portanto, ao se analisar a progressão de um tecido cicatrizado, a avaliação do colágeno é de fundamental importância.

Atualmente as amostras de colágeno são examinadas utilizando uma variedade de técnicas de imagens, que são subjetivas e frequentemente apresentam variabilidades no consenso avaliatório dos pesquisadores [13].

Implementar ferramentas de análises de imagens, que forneçam um método objetivo e repetível a essas avaliações seria vantajoso [13], e graças aos avanços na área da ciência da computação e ao desenvolvimento de softwares, a análise de imagens pode ser feita por uma ferramenta denominada dimensão fractal (DF) [14], que permite a análise mais precisa dos resultados. Estudos publicados na literatura evidenciam que quanto maior a concentração de colágeno nas áreas analisadas, maior será o seu valor de DF em relação as áreas com menores concentrações de colágeno, que por sua vez irão apresentar valores de DF inferiores a estas [15-17].

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo utilizar o método da dimensão fractal para avaliar a morfologia das fibras colágenas por meio de análises histológicas de feridas dérmicas

tratadas com FRP autóloga associada ou não ao uso da RSV em coelhos. A hipótese do presente estudo baseia-se na utilização de um analisador de imagens como auxiliar das análises histológicas na avaliação das fibras colágenas na reparação tecidual.

2. Material e métodos

2.1 Animais

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista – Unoeste - Presidente Prudente, São Paulo, Brasil (protocolo nº3478).

Foram utilizados 8 coelhos adultos, machos, clinicamente saudáveis, da raça Nova Zelândia, com peso médio de $3 \pm 1,0$ Kg, mantidos em gaiolas individuais, com temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e foto período (12 horas claro/escuro) controlados. Alimentados com dieta padronizada para coelhos e água *ad libitum*. Os animais passaram por um período de adaptação de sete dias antes do experimento, e os critérios de inclusão utilizados foram o estado de saúde, a integridade da pele, e o sexo.

2.2 Procedimento anestésico

Os coelhos foram contidos manualmente e foi realizada a tricotomia da região dorsal. Em seguida, os animais foram anestesiados com a associação de Cloridrato de Tiletamina e Zolazepam (Zoletil® 50, 30mg/Kg IM) e Xilazina a 2% (3mg/Kg). Feito isso foi aplicado o cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor (0,1mL/lesão subcutâneo) [18].

2.3 Feridas Cirúrgicas

Com os animais anestesiados, a pele foi demarcada com uma caneta preta hidrográfica, e com um punch de 8mm realizou-se a ferida em quatro lugares equidistantes na região dorsal de cada coelho (Figura 1). Na confecção das feridas foi retirada somente a pele preservando a musculatura. Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam o analgésico cloridrato de Tramadol, na dose de 4 mg/kg, IM, 2 vezes ao dia, durante 3 dias consecutivos [19].



Figura 1. A. Demonstração das feridas confeccionadas no dorso dos animais. B. respectivos tratamentos. FRPa (Fibrina rica em plaquetas autóloga); RSV (rosuvastatina); FRPa+RSV (fibrina rica em plaquetas autóloga e rosuvastatina).

2.4 Tratamentos

A ferida do lado esquerdo superior foi tratada com solução de cloreto de sódio a 0,9% representando o controle, a do lado direito superior foi tratada com FRP autólogo, a do lado esquerdo inferior recebeu a RSV gel a 1,2% e a do lado direito inferior recebeu a RSV gel a 1,2% associado ao FRP autólogo.

A primeira troca de curativos foi realizada ao terceiro dia após a indução das feridas. A partir disso, as trocas ocorreram a cada 4 dias, até completarem 17 dias de experimento. Em todos os momentos da troca de curativos (3,7,10,14, e 17º dias) foi realizado o tratamento das feridas seguindo o protocolo estabelecido por Vendramin et al. [20], e os fragmentos de pele foram coletados ao 17º dia [21-24].

2.5 Gel de Rosuvastatina (RSV)

Para a formulação do gel de RSV na concentração de 1,2% utilizou-se um solvente compatível para a diluição da droga, e posteriormente foi preparado um gel de polímero e metilcelulose, (gel aristoflex®, São Paulo, Brasil) com 20% de glicerina, que serviu como veículo para a RSV. A confecção do gel foi realizada segundo Grover et al. [25] com modificações, aquecendo a

solução em banho-maria a 50-60°C e homogeneizando o polímero com o solvente e a droga para que não houvesse a cristalização do ativo.

2.6 Fibrina Rica em Plaquetas (FRP)

Foram coletados 8ml de sangue periférico da veia auricular, utilizando scalp 25g e foram acondicionados em dois tubos sem a adição de anticoagulante. Após a coagulação natural, foi realizada a centrifugação em uma única vez a 200G(Excelsa Baby 206R, São Paulo, Brasil), por 10 minutos [26]. Formado o gel de fibrina, este foi separado dos demais componentes e utilizado para o tratamento das feridas superior e inferior do lado direito. O preparo da FRP aconteceu no momento dos tratamentos.

2.7 Histologia

As amostras de pele foram fixadas em solução de formol tamponado a 10% por um período de 48 horas. Após a fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, onde se obteve quatro cortes histológicos de quatro micrômetros de cada animal que foram corados com solução de Tricrômico de Masson (TM) e Picrosirius, para a avaliação do colágeno.

2.8 Captação de imagens

Para a captação de imagens, foi utilizado o microscópio de luz polarizada (Leica DMLB, São Paulo, SP, Brasil) acoplado a uma câmera (Leica DFC300 FX, São Paulo, SP, Brasil). As imagens observadas no microscópio foram projetadas para um monitor através de um software analisador de imagens (LeicaQwin Plus, São Paulo, Brasil). O sistema apresentava na tela do computador, a imagem original digitalizada a partir da lamina histológica. As imagens foram capturadas com a seguinte padronização: Aumento de 20 vezes, intensidade máxima de luz do microscópio e polarização em plano de 90°.

2.9 Dimensão Fractal

Para a análise da dimensão fractal da pele, as lâminas coradas tanto com TM quanto Picrosirius

foram binarizadas para a leitura e a dimensão fractal foi estimada pelo método-box-counting por meio do software ImageJ (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos– NIH), disponível gratuitamente na internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Foram fotografados 3 campos histológicos da área de lesão de cada animal.

A coloração de Picrosirius nos permite a diferenciação das fibras colágenas maduras (tipo I) que aparecem caracterizada pela birrefringência laranja e vermelha, e das fibras colágenas imaturas (tipo III) que por sua vez aparecem caracterizadas pela birrefringência verde [27]. As lâminas coradas pela coloração de Picrosirius passaram pelo processo *Split Channel*, que divide os canais da imagem. Por esse processo, as cores são projetadas para refletir as suas cores verdadeiras, isto é, com a função Split Channel, uma imagem pode ser dividida para os respectivos componentes de imagem, formando o sistema RGB: Vermelho (red), verde (green) e azul (blue), dessa forma, o verde de uma imagem RGB reflete a cor verde da amostra. [28]. Esse método foi então utilizado para se analisar separadamente tanto as fibras colágenas do tipo I, quanto as fibras colágenas do tipo III. O software considera o box-counting em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse espaço, não considerando, portanto, a textura da imagem. A influência disso é que duas imagens com a mesma distribuição de pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuem a mesma dimensão fractal.

Desta forma a análise das laminae histológicas fractais baseou-se na relação entre a resolução e a escala avaliada, e o resultado pode ser quantitativamente expresso com a dimensão fractal do objeto que é $DF = (\log N_r / \log r - 1)$. Sendo N_r a quantidade de elementos iguais necessários para preencher o objeto original e r a escala aplicada ao objeto. Com isso, a dimensão fractal calculada com o software ImageJ fica sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes.

2.10 Análise estatística

A avaliação do efeito dos tratamentos foi realizada com o programa estatístico GraphPad Prism,

versão 5.01. Para validação dos pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias foi realizado teste de normalidade dos dados (Shapiro Wilk) e de homogeneidade de variância entre os grupos (Bartlett). Para comparação entre os tratamentos foram realizados os testes Kruskal Wallis e Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

Quanto aos resultados apresentados por essa ferramenta de análise verificou-se que a média da DF nas lâminas coradas com TM não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,0561$). Porém, quando analisadas pela coloração Picrosirius, independente do tratamento utilizado, a média apresentada foi significativamente menor, sendo valor médio de $p=0,0042$. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados. As análises de dimensão fractal das lâminas coradas pelo método TM e Picrosirius ao 17º dia de tratamento estão descritos na tabela 1 e figura 2.

Tabela 1. Média e desvio-padrão da dimensão fractal do colágeno total de feridas experimentalmente induzidas em coelhos tratadas ou não com FRPa, RSV e associação ao 17º dia de tratamento, coradas com TM e Picrosirius

Tratamento	TM	Picrosirius
PELE ÍNTEGRA	1,83 ± 0,04	1,86 ± 0,06 *
C	1,78 ± 0,10	1,92 ± 0,02
FRPa	1,83 ± 0,07	1,93 ± 0,01
RSV	1,79 ± 0,08	1,93 ± 0,02
FRPa+RSV	1,78 ± 0,08	1,92 ± 0,01

Legenda: C (controle); FRPa (fibrina rica em plaquetas autóloga); RSV (rosuvastatina); FRPa+RSV (fibrina rica em plaquetas autóloga e rosuvastatina). * diferença significativa em relação aos diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

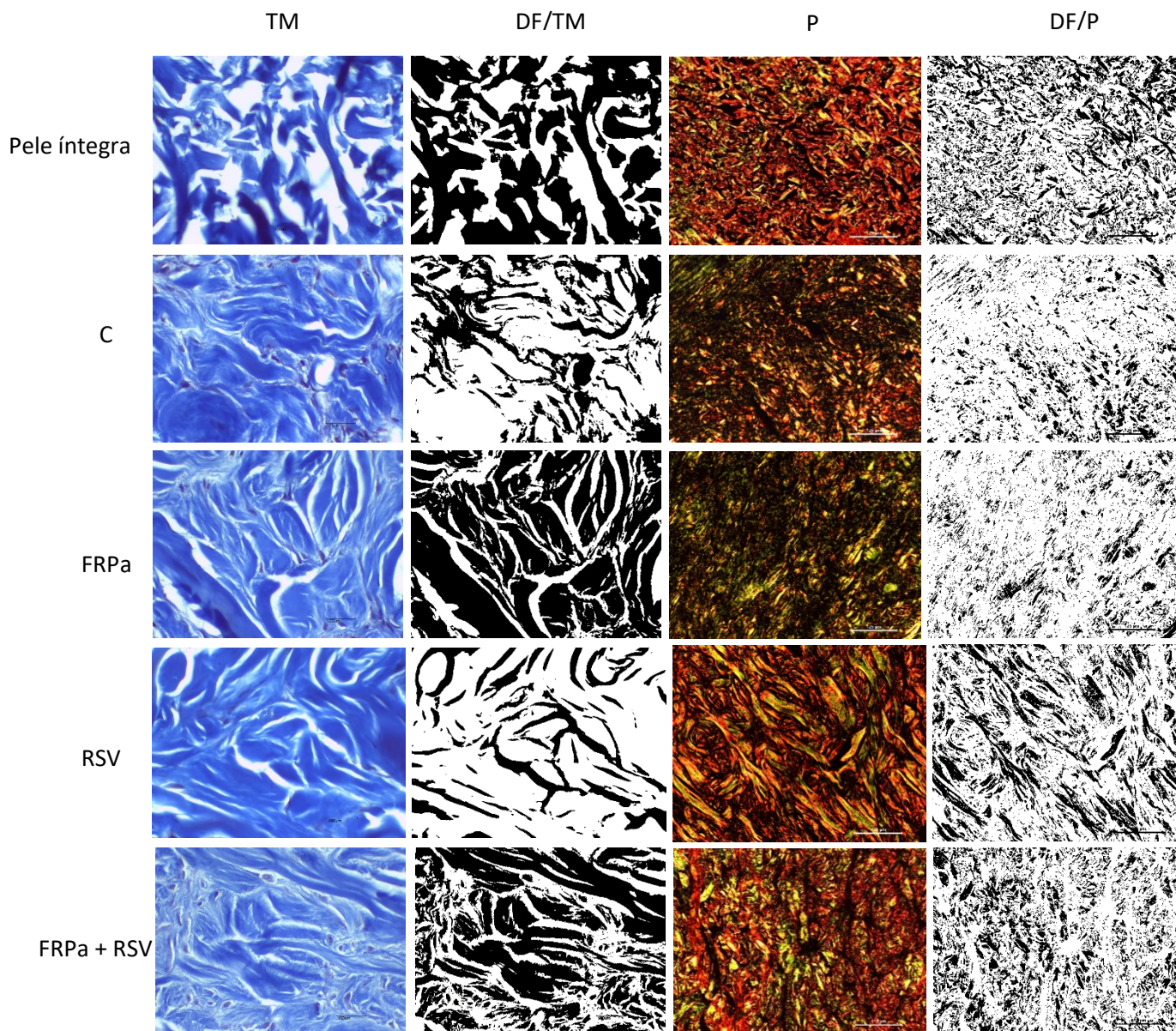
Ao se diferenciar os colágenos tipo I (red) e tipo III (green) da coloração de picrosirius pelo método *Split Channel* não houve diferença estatística significativa em nenhum dos grupos. O valor de p para red foi de 0,3255, e valor de p para green foi de 0,2529. As análises de dimensão fractal das lâminas coradas pelo método Picrosirius com a diferenciação dos colágenos tipo I e tipo III ao 17º dia de tratamento estão descritos na tabela 2

Tabela 2. Média e desvio-padrão da dimensão fractal dos colágenos tipo I (Red) e tipo III (Green) de feridas experimentalmente induzidas em coelhos tratadas ou não com FRPa, RSV e associação ao 17º dia de tratamento, coradas com Picrosirius

Tratamento	Red	Green
PELE ÍNTEGRA	1,82 ± 0,04	1,57 ± 0,06
C	1,87 ± 0,03	1,55 ± 0,04
FRPa	1,77 ± 0,15	1,53 ± 0,04
RSV	1,80 ± 0,15	1,51 ± 0,08
FRPa+RSV	1,87 ± 0,02	1,55 ± 0,04

Legenda: C (controle); FRPa (fibrina rica em plaquetas autóloga); RSV (rosuvastatina); FRPa+RSV (fibrina rica em plaquetas autóloga e rosuvastatina).

Figura 2. Microscopia e dimensão fractal das feridas experimentalmente induzidas em coelhos na pele íntegra e ao 17º dia.



Legenda: P;Picrosírius; DF/P: dimensão fractal de lâminas coradas com picrosirius; TM: Tricrômico de Masson; DF/TM; dimensão fractal de lâminas coradas com tricrômico de masson. C (controle); FRPa (fibrina rica em plaquetas autóloga); RSV (rosuvastatina); FRPa+RSV (fibrina rica em plaquetas autóloga e rosuvastatina). Aumento: 200x.

4. Discussão

A pele é uma barreira química e física essencial entre nossos corpos e o ambiente externo e requer propriedades mecânicas específicas para executar essa função [12]. Constantemente a pele é exposta a ocorrência de lesões, e neste sentido, a cicatrização é um processo vital [29]. Embora a aplicação da FRP, no processo de cicatrização, venha sendo descrita de forma ampla, sua relevância clínica é amplamente debatida, pois os resultados apresentados na literatura sobre o assunto são frequentemente confusos e contraditórios [30].

Pinto et al. [31] em seus estudos utilizaram a FRP semanalmente até o fechamento das úlceras de pele em humanos, e obtiveram sucesso na cicatrização das feridas, sem reincidência no período avaliado. Dessa forma, concluíram que a utilização da FRP representou uma terapia adjuvante segura, conveniente e fácil de usar, colaborando para a obtenção do tecido regenerado com mais qualidade. No presente estudo, houve um aumento da DF nas lesões que receberam tratamentos com biomateriais e/ou estatinas, demonstrando maior organização das fibras colágenas.

Horii et al. [32] descreveram o efeito da FRP aplicada topicamente para o tratamento da mucosite oral experimentalmente induzida por quimioterapia, em 93 hamsters e concluíram que o grupo tratado com FRP demonstrou melhoras significativas tanto no tamanho e nas características histológicas das úlceras, quanto na atividade da mieloperoxidase quando comparada ao grupo controle.

Algumas pesquisas evidenciam que tanto a FRP quanto outros concentrados plaquetários, não apresentam resultados satisfatórios, ou até mesmo não comprovam sua eficácia, em modelos experimentais para o tratamento de feridas [33-35]. Estes resultados podem ser explicados pela diferença entre os concentrados humano e animal, a complexidade e modelo das feridas [36], a versatilidade dos protocolos de preparação e a fraca identificação das características finais dos produtos [9].

Jia et al. [37], demonstraram a eficácia do tratamento com estatinas, com aplicações intradérmicas de pravastatina, e aplicação tópica de sinvastatina, em cicatrizes hipertróficas induzidas experimentalmente em orelhas de coelhos e concluíram que ao final de 28 dias, as estatinas reduziram significativamente as cicatrizes e seus índices de elevações. Wu et al. [38] analisaram o efeito da aplicação tópica da RSV na prevenção da adesão intra-articular do joelhos de ratos, e concluíram que a RSV impediu a formação da adesão articular, melhorou a atividade inflamatória e a deposição de colágeno nos locais cirúrgicos. No presente estudo, verificamos que as lesões tratadas com RSV associada ou não a FRP produziram um valor superior da DF, quando foram comparadas a pele íntegra.

Corroborando os efeitos positivos da RSV, Maged et al. [39] realizaram um estudo *in vitro*, e *in vivo*, em ratos albinos machos, associando a RSV a biomaterias, como as células-tronco mesenquimais e curativos de quitosana, e demonstraram sua atuação através do aumento da proliferação de fibroblastos dérmicos nos primeiros dias de cicatrização, onde a mesma auxiliou na reconstrução do colágeno na camada da derme, e colaborou para a obtenção de uma resposta positiva na regeneração tecidual e no processo de cicatrização após 30 dias.

Taniguchi et al. [40] analisaram a DF de feridas dérmicas de coelhos tratadas com plasma rico em plaquetas e RSV, e concluíram que o uso do referido medicamento apresentou significância clínica na primeira semana de tratamento, onde a RSV teve atuação na fase inflamatória do processo cicatricial, reorganizando as fibras colágenas e melhorando a qualidade da cicatriz.

Os resultados apresentados no referido estudo sugerem que os efeitos da RSV sejam evidenciados tanto na fase inicial da cicatrização, a inflamação, quanto na sua fase mais tardia, a remodelação, onde contribui para a obtenção de um tecido cicatricial de melhor qualidade.

Ao compararmos estes achados, com os do presente estudo, pudemos observar que a associação da RSV a FRP não proporcionou efeitos aditivos, o que pode ser explicado pelo período adotado para a avaliação (17 dias) que condiz com a fase da proliferação.

A coloração histológica de TM nos proporcionou a visualização das fibras colágenas do tecido conjuntivo, conferindo a coloração azul a todas estas fibras. Embora muito utilizada para detecção das fibras de colágeno, a coloração de TM pode levar a uma subestimativa do conteúdo de colágeno quando avaliados em conjunto com o microscópio de polarização, pois a mesma apresenta falhas ao revelar as fibras colágenas finas, fato esse que pode justificar as variações encontradas nas médias de DF entre a pele íntegra e o grupo tratado, e pode ser melhor demonstrado pela coloração de Picrosirius, que por sua vez demarca as fibras colágenas finas, não desbota, e em conjunto com a microscopia de luz polarizada nos permite a diferenciação das fibras colágenas[41].

A coloração de picrosirius sob a luz polarizada nos permitiu a visualização dos colágenos tipo I caracterizada pela birrefringência laranja e vermelha, e do colágeno tipo III caracterizado pela birrefringência verde [27]. As fibras colágenas do tipo I, foram mais evidentes e organizadas que as do tipo III, que estavam irregularmente distribuídas.

Embora nossos estudos não tenham encontrado diferença estatística significativa na diferenciação das fibras colágenas, pudemos observar que a média da DF do colágeno tipo I foi maior que do tipo III em todos os momentos e tratamentos. Nossa análise é condizente com os estudos encontrados na literatura [42] onde demonstram que tanto a pele íntegra, quanto na fase proliferativa a concentração de colágeno tipo I é superior a concentração do tipo III.

Além dos resultados obtidos, a DF é uma ferramenta cuja maior vantagem é possuir o mínimo de interferência do avaliador [43]. A DF de um objeto conta o número efetivo de graus de liberdade no sistema dinâmico e, portanto, quantifica a sua complexidade, assim, interfe-se que as imagens evidenciando maior dimensão fractal sejam, conseqüentemente, mais complexas [44]. Isso foi realmente percebido em nosso estudo, onde o aumento da DF sugeriu uma maior organização das fibras colágenas nas feridas que receberam tratamento. Frisch et al. [13] relataram em seus estudos que ao utilizarem a DF para quantificarem a organização das fibras

colágenas na cicatrização do ligamento de tendões de ratos, a mesma demonstrou boa aplicabilidade para avaliar a progressão da cicatrização, diminuindo significativamente a quantificação subjetiva da organização das fibras de colágeno.

Em nossos achados, pudemos observar que não houve diferenças estatisticamente significativas quando comparamos a FRP, a RSV e a associação de ambas em relação ao grupo tratado com cloreto de sódio a 0,9%, tampouco, houve diferença estatística na diferenciação dos colágenos tipo I e tipo III . A falta de significância clínica entre os grupos tratados, e nos diferentes tipos de colágeno demonstrados no presente estudo pode ser atribuída a algumas limitações do projeto. É plausível que um número superior de amostras, estendendo os tempos experimentais para privilegiar outras fases do processo de cicatrização poderiam contribuir para obter diferenças estatísticas.

Embora a eficácia dos concentrados de plaquetas permaneça em debate na literatura [9], o uso da FRP vem tendo um enorme aumento em muitos campos da medicina regenerativa, devido a sua facilidade de preparo, baixo custo, e por ao mesmo tempo, fornecer uma fonte completamente autóloga de fatores de crescimento [45].

Apesar do presente estudo não ter encontrado diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo controle, reforçamos a importância da utilização da FRPa e da RSV como novas opções terapêuticas por oferecerem grandes perspectivas na área da engenharia tecidual, ademais estudos sobre a associação de ambas no tratamento de feridas, faz-se necessário.

Concluimos que a utilização da DF mostrou-se eficiente para a análise do colágeno em feridas dérmicas experimentalmente induzidas. Essa ferramenta de avaliação, ao adicionar um valor numérico objetivo, pode auxiliar os achados histológicos, permitindo uma mensuração padronizada dos mesmos e possibilitando um consenso entre os profissionais, diminuindo o julgamento subjetivo e os baixos índices de concordância que eram empregados pelo aspectos visuais.

Referências:

- [1] R. Xu, G. Luo, H. Xia, W. He, J. Zhao, B. Liu, J. Tan, J. Zhou, D. Liu, Y. Wang, Z. Yao, R. Zhan, S. Yang, J. Wu, Novel bilayer wound dressing composed of silicone rubber with particular micropores enhanced wound re-epithelialization and contraction, *Biomaterials*. 40 (2015) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.077>.
- [2] R. Zinder, R. Cooley, L.G. Vlad, J.A. Molnar, Vitamin A and Wound Healing, *Nutr Clin Pract*. 34 (2019) 839–849. <https://doi.org/10.1002/ncp.10420>.
- [3] A. Shedoeva, D. Leavesley, Z. Upton, C. Fan, Wound Healing and the Use of Medicinal Plants, *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019 (2019) 1–30. <https://doi.org/10.1155/2019/2684108>.
- [4] R. Vinaya Kumar, N. Shubhashini, Platelet rich fibrin: a new paradigm in periodontal regeneration, *Cell Tissue Bank*. 14 (2013) 453–463. <https://doi.org/10.1007/s10561-012-9349-6>.
- [5] C. Yu, Z.-Q. Hu, R.-Y. Peng, Effects and mechanisms of a microcurrent dressing on skin wound healing: a review, *Mil Med Res*. 1 (2014) 24. <https://doi.org/10.1186/2054-9369-1-24>.
- [6] R.J. Miron, Y. Zhang, Autologous liquid platelet rich fibrin: A novel drug delivery system, *Acta Biomater*. 75 (2018) 35–51. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.021>.
- [7] A. Göral, C. Aslan, B. Bolat Küçükzeybek, D. Işık, M. Hoşnuter, M. Durgun, Platelet-Rich Fibrin Improves the Viability of Diced Cartilage Grafts in a Rabbit Model, *Aesthet Surg J*. 36 (2016) NP153–NP162. <https://doi.org/10.1093/asj/sjv193>.
- [8] D.M. Dohan, J. Choukroun, A. Diss, S.L. Dohan, A.J.J. Dohan, J. Mouhyi, B. Gogly, Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 101 (2006) e37–e44. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.008>.
- [9] C. Zumarán, M. Parra, S. Olate, E. Fernández, F. Muñoz, Z. Haidar, The 3 R's for Platelet-

Rich Fibrin: A “Super” Tri-Dimensional Biomaterial for Contemporary Naturally-Guided Oro-Maxillo-Facial Soft and Hard Tissue Repair, Reconstruction and Regeneration, *Materials (Basel)*. 11 (2018) 1293. <https://doi.org/10.3390/ma11081293>.

[10] M. Madi, A. Kassem, Topical simvastatin gel as a novel therapeutic modality for palatal donor site wound healing following free gingival graft procedure, *Acta Odontol Scand*. 76 (2018) 212–219. <https://doi.org/10.1080/00016357.2017.1403648>.

[11] I. Husain, S. Khan, S. Khan, T. Madaan, S. Kumar, A.K. Najmi, Unfolding the pleiotropic facades of rosuvastatin in therapeutic intervention of myriads of neurodegenerative disorders, *Clin Exp Pharmacol Physiol*. (2018). <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13040>.

[12] G. Theocharidis, J.T. Connelly, Minor collagens of the skin with not so minor functions, *J. Anat*. 235 (2019) 418–429. <https://doi.org/10.1111/joa.12584>.

[13] K.E. Frisch, S.E. Duenwald-Kuehl, H. Kobayashi, C.S. Chamberlain, R.S. Lakes, R. Vanderby, Quantification of collagen organization using fractal dimensions and Fourier transforms, *Acta Histochem*. 114 (2012) 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.03.010>.

[14] F.E. Lennon, G.C. Cianci, N.A. Cipriani, T.A. Hensing, H.J. Zhang, C.-T. Chen, S.D. Murgu, E.E. Vokes, M.W. Vannier, R. Salgia, Lung cancer—a fractal viewpoint, *Nat Rev Clin Oncol*. 12 (2015) 664–675. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.108>.

[15] 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, *Biochem Biophys Res Commun*. 516 (2019) 888–893. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.002>.

[16] M. Muthu Rama Krishnan, P. Shah, C. Chakraborty, A.K. Ray, Statistical analysis of textural features for improved classification of oral histopathological images, *J Med Syst*. 36 (2012) 865–881. <https://doi.org/10.1007/s10916-010-9550-8>.

[17] G. Ozaki, R.C.T. Camargo, T.E. Koike, T.A. Garcia, R.C. Castoldi, J.C.S. Camargo Filho,

Fractal Analysis of Skeletal Muscle Tissue of Rats Subjected to Stretch Injury, *Int. J. Morphol.* 33 (2015) 908–913. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022015000300017>.

[18] G.P. Kanashiro, R.N. Cassu, Anestesia em animais selvagens e de laboratório. In: Andrade, S.F. *Manual de terapêutica veterinária*. São Paulo: Roca, 2008. p.728-745.

[19] D. C. Winter , S. F. S. Moraes , E. D. V, Conceição, Efeito analgésico de anestesia epidural com cloridrato de tramadol em coelhos submetidos a implantes de blenda de amido de mandioca e álcool polivinílico, *Sci. Elec. Arch.* 11 (2018) 52-60.

[20] F.S. Vendramin, D. Franco, T.R. Franco, Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas, *Rev. Bras. Cir. Plást.* 25 (2010) 589–594. <https://doi.org/10.1590/S1983-51752010000400004>.

[21] K.G.B. Abegão, B.N. Bracale, I.G. Delfim, E.S. dos Santos, C.B. Laposy, G.A. Nai, R. Giuffrida, R.M.B. Nogueira, Effects of heterologous platelet-rich plasma gel on standardized dermal wound healing in rabbits, *Acta Cir Bras.* 30 (2015) 209–215. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020150030000008>.

[22] D.V. Barrionuevo, C.B. Laposy, K.G.B. Abegão, R.M.B. Nogueira, G.A. Nai, B.N. Bracale, I.G. Delfim, Comparison of experimentally-induced wounds in rabbits treated with different sources of platelet-rich plasma, *Lab Anim.* 49 (2015) 209–214. <https://doi.org/10.1177/0023677214567747>.

[23] M.E.M. Marques, C.B. Laposy, M.L.D.S. Silva, M.R.S. Breda, M.M. Matsumoto, L.A. Justulin Junior, G.A. Nai, G.A.T. Ozaki, J.C. Camargo Filho, R.M.B. Nogueira, Collagen quantification in rabbit dermal wounds treated with heterologous platelet-rich plasma gel, *Semina: Ciênc. Agrár.* 38 (2017) 249. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n1p249>.

[24] E.S. Santos, C.B. Laposy, K.G.B. Abegão, R.M.B. Nogueira, G.A. Nai, B.N. Bracale, I.G. Delfim, Assessment of the healing of standardized wounds in rabbits treated serially with autologous platelet-rich plasma gel, *Semina: Ciênc. Agrár.* 37 (2016) 4131. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n6p4131>.

- [25] H.S. Grover, S. Kapoor, A. Singh, Effect of topical simvastatin (1.2 mg) on gingival crevicular fluid interleukin-6, interleukin-8 and interleukin-10 levels in chronic periodontitis - A clinicobiochemical study, *J Oral Biol Craniofac Res.* 6 (2016) 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.11.003>.
- [26] M.C.M.P.S. Azevedo, *Aplicação do PRF em medicina dentária*. 2014. 29 f. 351. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina Dentária) – Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Porto-Portugal.2014.
- [27] R. Coleman, Picrosirius red staining revisited, *Acta Histochem.* 113 (2011) 231–233. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.002>.
- [28] Color Image Processing, Imagej. https://imagej.net/Color_Image_processing (accessed August 25,2020).
- [29] J.M. Reinke, H. Sorg, Wound repair and regeneration, *Eur Surg Res.* 49 (2012) 35–43. <https://doi.org/10.1159/000339613>.
- [30] D.M. Dohan Ehrenfest, I. Andia, M.A. Zumstein, C.-Q. Zhang, N.R. Pinto, T. Bielecki, Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives, *Muscles Ligaments Tendons J.* 4 (2014) 3–9.
- [31] N.R. Pinto, M. Ubilla, Y. Zamora, V. Del Rio, D.M. Dohan Ehrenfest, M. Quirynen, Leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) as a regenerative medicine strategy for the treatment of refractory leg ulcers: a prospective cohort study, *Platelets.* 29 (2018) 468–475. <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1327654>.
- [32] K. Horii, T. Kanayama, H. Miyamoto, T. Kohgo, T. Tsuchimochi, T. Shigetomi, M. Yokoi, Platelet-rich fibrin has a healing effect on chemotherapy-induced mucositis in hamsters, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 117 (2014) 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2013.12.004>.
- [33] F. Camacho-Alonso, P. López-Jornet, M.J. Jiménez-Torres, A. Orduña-Domingo, Wound

Healing with PRGF Infiltration in CO₂ Laser Lesions of the Tongue: An Animal Study, *Photomed Laser Surg.* 27 (2009) 487–491. <https://doi.org/10.1089/pho.2008.2289>.

[34] S.O. Monteiro, O.M. Lepage, C.L. Theoret, Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses, *Am J Vet Res.* 70 (2009) 277–282. <https://doi.org/10.2460/ajvr.70.2.277>.

[35] P. Danielsen, B. Jørgensen, T. Karlsmark, L.N. Jorgensen, M.S. Agren, Effect of topical autologous platelet-rich fibrin versus no intervention on epithelialization of donor sites and meshed split-thickness skin autografts: a randomized clinical trial, *Plast Reconstr Surg.* 122 (2008) 1431–1440. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e318188202c>.

[36] A. Cieslik-Bielecka, J. Choukroun, G. Odin, D.M. Dohan Ehrenfest, L-PRP/L-PRF in esthetic plastic surgery, regenerative medicine of the skin and chronic wounds, *Curr Pharm Biotechnol.* 13 (2012) 1266–1277. <https://doi.org/10.2174/138920112800624463>.

[37] S. Jia, P. Xie, S.J. Hong, R.D. Galiano, T.A. Mustoe, Local Application of Statins Significantly Reduced Hypertrophic Scarring in a Rabbit Ear Model, *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 5 (2017) e1294. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000001294>.

[38] H. Wu, A.V. Germanov, G.L. Goryaeva, A.N. Yachmenev, D.I. Gordienko, V.V. Kuzin, A.V. Skoroglyadov, The Topical Application of Rosuvastatin in Preventing Knee Intra-Articular Adhesion in Rats, *Med Sci Monit.* 22 (2016) 1403–1409. <https://doi.org/10.12659/MSM.898237>.

[39] A. Maged, A.A. Abdelkhalek, A.A. Mahmoud, S. Salah, M.M. Ammar, M.M. Ghorab, Mesenchymal stem cells associated with chitosan scaffolds loaded with rosuvastatin to improve wound healing, *Eur J Pharm Sci.* 127 (2019) 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.11.002>.

[40] B.A. Taniguchi, M.R.S. Breda, R.M.B. Nogueira, G.A. Nai, C.B. Laposy, Fractal features of rabbit dermal wounds treated with platelet-rich plasma and topical rosuvastatin, *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11(11):5241-5248.

- [41] H.P. Sing, D.C. Shetty, V. Wadhwan, P. Aggarwal, A quantitative and qualitative comparative analysis of collagen fibers to determine the role of connective tissue stroma on biological behavior of odontogenic cysts: A histomechemical study, *Natl J Maxillofac Surg.* 3 (2012) 15-20. <https://doi.org/10.4103/0975-5950.102142>.
- [42] M.C. Robson, D.L. Steed, M.G. Franz, Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories, *Curr Probl Surg.* 38 (2001) 72–140. <https://doi.org/10.1067/msg.2001.111167>.
- [43] T.A. Garcia, G.A. Tamura Ozaki, R.C. Castoldi, T.E. Koike, R.C. Trindade Camargo, J.C. Silva Camargo Filho, Fractal dimension in the evaluation of different treatments of muscular injury in rats, *Tissue and Cell.* 54 (2018) 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.08.014>.
- [44] R.D. Moreira, A.R. Moriel, L.O. Murta Junior, L.A. Neves, M.F. de Godoy, Dimensão fractal na quantificação do grau de rejeição celular miocárdica pós-transplante cardíaco, *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 26 (2011) 155–163. <https://doi.org/10.1590/S0102-76382011000200004>.
- [45] R.J. Miron, M. Bishara, J. Choukroun, Basics of Platelet-Rich Fibrin Therapy, *Dent Today.* 36 (2017) 74–76.

ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE USO DE ANIMAIS (CEUA)

22/11/2019

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

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

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "DIMENSÃO FRACTAL DE FERIDAS DÉRMICAS DE COELHOS TRATADAS COM FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E ROSUVASTATINA", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 5168 e tendo como participante(s) MICHEL FERNANDO BENTO DA SILVA (discente), YURI FERREIRA VICENTINI (discente), ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (docente), GISELE ALBORGHETTI NAI (docente), CECILIA LAPOSY SANTAREM (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

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

MATERIAL ARMAZENADO/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
3478	27/02/2017	UNOESTE	NÃO	Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Unoeste

Presidente Prudente, 20 de Fevereiro de 2019.



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



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

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação – CPDI – 18 3228-2079 – cpdi@unoeste.br
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP – 18 3228-2079 – cep@unoeste.br
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – 18 3228-2079 – ceua@unoeste.br

valide este documento em www.unoeste.br/sgp informando o código de segurança 8f48eb55ab05096e08aaa6eb46947a3

<https://www.unoeste.br/SGP/certificados/ver.asp?h=8f48eb55ab05096e08aaa6eb46947a3>

1/1

ANEXO B- NORMAS DE PUBLICAÇÃO


BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS
AUTHOR INFORMATION PACK
TABLE OF CONTENTS

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



ISSN: 0006-291X

DESCRIPTION

BBRC -- the fastest submission-to-print journal!

Number 1 journal in the Thomson's JCR ranking for **Biophysics** in terms of Total Cites and Number of Articles.

From Submission to Online in Less Than 3 Weeks!

Biochemical and Biophysical Research Communications is the premier international journal devoted to the very rapid dissemination of timely and significant experimental results in diverse fields of biological research. The development of the "Breakthroughs and Views" section brings the minireview format to the journal, and issues often contain collections of special interest manuscripts. *BBRC* is published weekly (52 issues/year).

Research Areas now include:

- **Biochemistry**
- **Bioinformatics**
- **Biophysics**
- **Cancer Research**
- **Cell Biology**
- **Developmental Biology**
- **Immunology**
- **Molecular Biology**
- **Neurobiology**
- **Plant Biology**
- **Proteomics**

Benefits to authors

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

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Biochemists, bioinformaticians, biophysicists, immunologists, cancer researchers, stem cell scientists and neurobiologists.

IMPACT FACTOR

2018: 2.705 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2019

ABSTRACTING AND INDEXING

Scopus
 Embase
 EMBiology
 Biological Abstracts
 Chemical Abstracts
 Current Contents - Life Sciences
 Embase
 PubMed/Medline
 Science Citation Index
 Web of Science

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Wolfgang Baumeister, Max-Planck-Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany

Special Content Editor

Ernesto Carafoli, University of Padua, Vicenza, Italy

Managing Editor

Michael Lacy, Elsevier Inc, New York, New York, United States

Editors

Christoph Alexiou, Erlangen University Hospital, Erlangen, Germany

Ilya Bezprozvanny, UNIVERSITY OF TEXAS SOUTHWESTERN MEDICAL CENTER, Dallas, United States

Zengyi Chang, Peking University, Beijing, China

Chin Ha Chung, Seoul National University School of Biological Sciences, Seoul, Korea, Republic of

Vitaly Citovsky, Stony Brook University Department of Biochemistry and Cell Biology, Stony Brook, United States

Bengt Fadeel, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

Félix M. Goñi, University of the Basque Country Department of Biochemistry, Leioa, Spain

Barry Halliwell, National University of Singapore, Singapore, Singapore

Hans Jörnvall, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

Yong-Keun Jung, Seoul National University School of Biological Sciences, Seoul, Korea, Republic of

Guido Kroemer, National Institute of Health and Medical Research, Paris, France

M. Lichten, Bethesda, Maryland, United States

Konstantin A. Lukyanov, Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Russian Federation

Anders Lund, University of Copenhagen, København, Denmark

Carlos Martínez-A., National Centre for Biotechnology, Madrid, Spain

Hisao Masai, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science Department of Genome Medicine, Tokyo, Japan

Katsuhiko Mikoshiba, ShanghaiTech University, Shanghai, China

Davis Ng, National University of Singapore, Singapore, Singapore

James Ntambi, University of Wisconsin Madison, Madison, United States

Sergio Pantano, Pasteur Montevideo Institute, Montevideo, Uruguay

Duanqing Pei, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Guangzhou, China

Jacques Pouyssegur, Valrose Institute of Biology, Nice, France

Luigia Santella, Zoological Station Anton Dohrn, Napoli, Italy

Igor Stagljar, University of Toronto, Toronto, Canada

Bing Su, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China

Kiyoshi Takatsu, University of Toyama Department of Immunobiology and Pharmacology, Toyama, Japan

Naoyuki Taniguchi, Osaka International Cancer Institute, Osaka, Japan

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Biochemical and Biophysical Research Communications is the premier international journal devoted to the very rapid dissemination of timely and significant experimental results in diverse fields of biological research. Research Areas now include: Biochemistry Biophysics Cell Biology Developmental Biology Immunology Molecular Biology Neurobiology Plant Biology Proteomics

Types of paper

BBRC accepts short communications. Special content, such as reviews and thematic issues, are by invitation-only.

Contact details for submission

Papers should be submitted using the BBRC online submission system <http://ees.elsevier.com/bbrc>. Authors who have questions regarding the electronic submission process should contact the Editorial Office prior to submission (e-mail: bbrc@elsevier.com; telephone: +91 44 4299 4826).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

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

Studies in humans and animals

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

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

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Conflict of Interest

Biochemical and Biophysical Research Communications follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission: (1) All third-party financial support for the work in the submitted manuscript. (2) All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript. (3) All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission. (4) Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported. (5) Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued). (6) Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work. As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information will be acknowledged at publication in a Transparency Document link directly in the article. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org/>. The form for conflict of interest disclosure can be downloaded here: http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (if this link does not display properly in your browser, please right-click the link and select "Save Target As..." or "Save Link as..." from the pop-up menu).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in

English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

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

Use of inclusive language

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

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.

Changes to authorship

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

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

Article transfer service

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

Copyright

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

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

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

Author rights

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

Elsevier supports responsible sharing

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

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Elsevier journals comply with current NIH public access policy.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2450**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an

appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more.](#)

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

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

Language (usage and editing services)

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

Submission

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

Peer Review Policy

The practice of peer review is to ensure that good science is published. It is an objective process at the heart of good scholarly publishing and is carried out on all reputable scientific journals. Our Editorial Board therefore plays a vital role in maintaining the high standards of BBRC while ensuring that it retains the speed of publication necessary for a rapid communication journal.

Type of Peer Review

BBRC is a rapid communications journal. As such, the decision to publish an article rests entirely with the handling Editor. There is no need for authors to suggest an Editor. Manuscripts are assigned to members of the Editorial Board based on expertise. This Editor may accept the manuscript as it is, send it to a colleague for review, or reject it. Requests for revisions are rare. Should the Editor request revisions, the manuscript will be treated as a new submission.

How long does the review process take?

Authors of manuscripts can expect an accept or reject decision normally within 2 weeks of receipt. Publication will then take place immediately unless the author has, upon submission, requested an embargo.

Mini Reviews

This section includes invited mini reviews, commentaries, and views on relevant subject matter, not simply short papers. Authors should only submit a manuscript for this section if invited by an Editor. In the cover letter authors should indicate that they are "submitting a manuscript for the Mini Reviews section," and the name of the commissioning Editor. The authors of mini reviews may, if they wish, include a limited number of annotated references. Two hypothetical examples follow:

- [1] J.Y. Smith, S.S. Doe, A novel retinoid-response gene set in vascular smooth muscle cells, *J. Biol.* 280 (2000) 5-8. [A very concise review of recent findings.]
 [2] J.Y. Black, R.J. Blue, Magnetic field exposure induces DNA degradation, *Biol. Acta* 120 (2001) 20-29. [The first study presenting detailed information on the enzyme activity.]

PREPARATION

Use of wordprocessing software

Please submit your paper in Word Document format. Include a cover letter with your submission to appear before the manuscript. It should be in letter format and address the submission to BBRC, including a brief outline of the manuscript and why you think it is important to the readers of BBRC. The text of the manuscript should be in single-column format and include page numbers. Keep the layout of the text as simple as possible. Please do not include any line numbers or running

headers or footers such as the manuscript title or corresponding author name. Please remove any "hidden edits" from your paper prior to submission by using track changes then accept changes. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Manuscript size and length

Manuscripts should be double-spaced throughout, with a minimum of 1-inch margins. The built PDF of the manuscript cannot exceed 3MB in size. The length of the article when published will not exceed 6 printed journal pages, including all figures and tables. To achieve this, the submitted article length must be no greater than **4,600 words and 4 figures** (n.b. any figure larger than half a page will be counted as two figures). The 4,600 word count includes the title page, all sections of the manuscript (including the references), and the figure and table legends.

Submissions should be organized as follows:

Cover letter

Title page

Manuscript text: Abstract Keywords Introduction Materials and Methods Results Discussion Acknowledgements References Figure/Table Legends Figures/Tables Supplementary Material

Article structure

Introduction

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

Material and methods

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

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Essential title page information

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

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

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

Highlights

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

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

Abstract

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

Graphical abstract

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

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

Keywords

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

Abbreviations

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

Acknowledgements

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

Formatting of funding sources

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

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

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

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

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

Standards for Reporting Enzymology Data (STRENDa)

This journal follows the recommendations of the STRENDa (Standards for Reporting Enzymology Data) Commission of the Beilstein-Institut for the reporting of kinetic and equilibrium binding data. Detailed guidelines can be found at (<http://www.strenda.org/documents.html>) or in this [pdf](#) file.

All reports of kinetic and binding data must include a description of the identity of the catalytic or binding entity (enzyme, protein, nucleic acid or other molecule). This information should include the origin or source of the molecule, its purity, composition, and other characteristics such as post-translational modifications, mutations, and any modifications made to facilitate expression or purification. The assay methods and exact experimental conditions of the assay must be fully described if it is a new assay or provided as a reference to previously published work, with or without modifications. The temperature, pH and pressure (if other than atmospheric) of the assay **must** always be included, even if previously published. In instances where catalytic activity or binding cannot be detected, an estimate of the limit of detection based on the sensitivity and error analysis of the assay should be provided. Ambiguous terms such as "not detectable" should be avoided. A description of the software used for data analysis should be included along with calculated errors for all parameters.

First-order and second-order rate constants: see [pdf](#) for full instructions.

Footnotes

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

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

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

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

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

Formats

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

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

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

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

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.
 TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

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

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

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

Tables

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

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

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

Data references

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

References in a special issue

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

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal,

please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

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

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/biochemical-and-biophysical-research-communications>

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

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.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 an edited 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, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

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

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

You must also list a minimum of 3 authors associated with a cited work before using "et al." in each of your references.

Journal abbreviations source

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

Video

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

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article

and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

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

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

Data linking

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

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

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

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

Mendeley Data

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

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

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple *MethodsX* articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. *MethodsX*, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their *MethodsX* article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will

automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

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

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Research Highlights
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at service.elsevier.com.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

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

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

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

AUTHOR INQUIRIES

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

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

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>