



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

ANA FLÁVIA SORIANO PEREIRA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO BACTERIOSTÁTICO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS (PRP) EM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SENSÍVEL A METICILINA
(MSSA) E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTES A METICILINA (MRSA)
PELO TESTE *KILL CURVE ASSAY***



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

ANA FLÁVIA SORIANO PEREIRA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO BACTERIOSTÁTICO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS (PRP) EM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SENSÍVEL A METICILINA
(MSSA) E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTES A METICILINA (MRSA)
PELO TESTE *KILL CURVE ASSAY***

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

Orientadora:
Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira
Co-Orientador:
Dr. Rodrigo Costa Silva

Presidente Prudente - SP
2021

636.089
P246a

Pereira, Ana Flávia Soriano.
Avaliação *in vitro* do efeito bacteriostático do plasma rico em plaquetas (PRP) em *staphylococcus aureus* sensível a metilina (MSSA) e *staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) pelo teste *kill curve assay* / Ana Flávia Soriano Pereira. – Presidente Prudente, 2021.
64f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2021.
Bibliografia.
Orientador: Rosa Maria Barilli Nogueira
Co-Orientador: Rodrigo Costa Silva

1. Estafilococos. 2. Resistência Bacteriana. 3. Interação plaqueta-leucócito. 4. Conteúdo plaquetário. I. Título.

Catálogo na Fonte: Michele Mologni – CRB 8 -6204

ANA FLÁVIA SORIANO PEREIRA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO BACTERIOSTÁTICO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) EM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SENSÍVEL A METICILINA (MSSA) E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTES A METICILINA (MRSA) PELO TESTE *KILL CURVE ASSAY*

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

Presidente Prudente, 04 de novembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Márcia Zilioli Bellini
Centro Universitário de Adamantina-UNIFAI
Adamantina – SP

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família e noivo, que se dedicaram ao máximo para que eu conquistasse todos os meus sonhos até agora e sempre foram pilar em minha jornada me mantendo em pé.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela força e coragem durante esta caminhada.

À minha mãe Eliete Soriano Pereira e irmão Luiz Guilherme Soriano Pereira assim como meu noivo Lucas Martins Pacheco que, com muito carinho, apoio, compreensão e colaboração acreditaram em mim, entenderam minha ausência e me incentivaram a continuar diante de todas as dificuldades.

E em especial com todo meu amor, carinho e saudade (in memoriam) ao meu pai amado Aldo Pereira Junior que tanto me apoiou e sonhou com o término desse trabalho, e meu irmão Luiz Eduardo Soriano Pereira que do céu celebrou minha vitória como sempre fez aqui na terra.

A minha orientadora, Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira, uma grande mulher, que me aceitou como sua orientanda e dividiu comigo seus projetos e sonhos. Não tenho como agradecer tudo o que fez por mim. Você é uma pessoa iluminada, daquelas diferentes que apareçam e marcam nossas vidas. Obrigada por estar ao meu lado nos melhores e piores momentos, sempre me incentivando e compartilhando comigo dos meus choros e sorrisos. E no fim de cada conversando me motivando com a seguinte frase “Tenho certeza que você consegue e dá conta Ana”. Obrigada por tudo.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rodrigo Costa Silva, que tanto colaborou para a realização deste trabalho ajudando na parte experimental, nas análises do projeto, assim como em todas as etapas do trabalho não medindo esforços para nos ajudar, você foi fundamental para a concretização do trabalho obrigada pela ajuda e disponibilização de tempo para toda realização do projeto.

A Unoeste, pela oportunidade de estudo no Mestrado e por todo o apoio dos profissionais que nos atendem com dedicação, especialmente Keid Ribeiro Kruger.

A Banca examinadora por ter aceito o convite de participar deste momento tão importante.

À CAPES pelo incentivo financeiro concedido: “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES.

Obrigada a todos!

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

RESUMO

Avaliação *in vitro* do efeito bacteriostático do plasma rico em plaquetas (PRP) em *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA) e *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) pelo teste *kill curve assay*

Infecções estafilocócicas apresentam relevância pela frequência que ocorrem e gravidade. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é uma bactéria Gram-positiva relevante por comumente causar infecções, pelo aumento dos casos de resistência, se desenvolvendo rapidamente e representando um grave problema de saúde pública no mundo. As plaquetas têm destaque na participação em processos infecciosos e inflamatórios pela interação com o patógeno, em especial as bactérias e as células de defesa podem ser obtidas em maior concentração no plasma rico em plaquetas (PRP), um concentrado de sangue com diferentes concentrações de fatores de crescimento, plaquetas e leucócitos, e que vem sendo utilizado de forma multidisciplinar, em regeneração tecidual e com propriedades antimicrobianas. Diante da hipótese que as plaquetas são as responsáveis pelo efeito bacteriostático do PRP frente ao *S. aureus*, objetivou-se avaliar o efeito bacteriostático *in vitro* de plaquetas caninas sobre *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) utilizando-se compostos contendo diferentes concentrações de plaquetas e leucócitos caninos. Desenhou-se estudo experimental controlado randomizado em bloco, comparando-se o efeito bacteriostático das plaquetas, em 6 grupos experimentais frente MRSA (G1-G6) e MSSA (G7-G12): G1 e G7, salina; G2 e G8, controle negativo; G3 e G9, meio de cultura; G4 e G10, PRP, G5 e G11, plasma puro rico em plaquetas (P-PRP), e G6 e G12, leucócitos isolados (WBC). Utilizou-se o modelo de teste *kill curve assay* para avaliar a multiplicação bacteriana por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) em meio de cultura Mueller-Hinton (MHB), após incubação das bactérias com seus respectivos tratamentos em caldo MHB por 0h, 1h e 2 horas. PRP apresentou taxa de contaminação por leucócitos de 1:12,59 plaquetas, não observada no P-PRP, permitindo a avaliação individualizada das plaquetas sobre as bactérias. Para ambas as bactérias, observou-se que leucócitos (WBC) e a interação plaqueta:leucócito induziram uma redução na multiplicação bacteriana ao longo do experimento, não havendo diferença significativa entre os time points ($p > 0,05$). Os efeitos dos tratamentos a cada momento e comparativo ao grupo controle basal (G1 e G7), observou-se comportamento similar para ambas as bactérias na primeira hora de incubação, com redução da multiplicação bacteriana nos grupos tratados somente com WBC (G5 = -2,86x; G11 = -8,79 x), seguido pelo tratamento com PRP (G4 = -1,69x; G10 = -3,96x), fato este observado na segunda hora de incubação, porém com redução da multiplicação bacteriana no G5 (-1,07x) e G11 (-2,36x), e uma intensa redução no grupo PRP somente para MSSA (G10 = -8,03x), fato este não observado para MRSA (G5 = 1,33x). Interessantemente, as plaquetas isoladas estimularam a multiplicação bacteriana tanto na primeira hora de incubação (G6 = 1,53x; G12 = 1,24x), quanto na segunda hora (G12 = 1,50x), com exceção do G6 (-1,16x). Este efeito pode ser devido a interação física plaqueta:leucócito, como do conteúdo dos grânulos plaquetários e leucócitos. Assim, as plaquetas desempenham papel importante na inibição/redução da multiplicação bacteriana *in vitro* de MRSA e MSSA quando na presença de leucócitos, enfatizando a interação sinérgica principalmente nos primeiros momentos de exposição ao patógeno.

Palavras chaves: Estafilococos. Resistência bacteriana. Interação plaqueta-leucócito. Conteúdo plaquetário.

ABSTRACT

***In vitro* evaluation of the bacteriostatic effect of platelet-rich plasma (PRP) on methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by the kill curve assay**

Staphylococcal infections are relevant for their frequency and severity. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a relevant Gram-positive bacterium because it commonly causes infections, because of the increase in resistance cases, it develops quickly and represents a serious public health problem in the world. Platelets stand out in their participation in infectious and inflammatory processes due to their interaction with the pathogen, in particular bacteria and defense cells can be obtained in higher concentration in platelet-rich plasma (PRP), a concentrate of blood with different concentrations of factors of growth, platelets and leukocytes, and that has been used in a multidisciplinary way, in tissue regeneration and with antimicrobial properties. Given the hypothesis that platelets are responsible for the bacteriostatic effect of PRP against *S. aureus*, this study aimed to evaluate the *in vitro* bacteriostatic effect of canine platelets on methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) using compounds containing different concentrations of platelets and canine leukocytes. A randomized block experimental study was designed, comparing the bacteriostatic effect of platelets, in 6 experimental groups against MRSA (G1-G6) and MSSA (G7-G12): G1 and G7, saline; G2 and G8, negative control; G3 and G9, culture medium; G4 and G10, PRP, G5 and G11, pure platelet-rich plasma (P-PRP), and G6 and G12, isolated leukocytes (WBC). The kill curve assay model was used to assess bacterial multiplication by counting colony-forming units (CFU/mL) in Mueller-Hinton (MHB) culture medium, after incubation of the bacteria with their respective treatments in MHB broth by 0h, 1h and 2 hours. PRP had a leukocyte contamination rate of 1:12.59 platelets, not observed in P-PRP, allowing the individualized evaluation of platelets on bacteria. For both bacteria, it was observed that leukocytes (WBC) and platelet:leukocyte interaction induced a reduction in bacterial multiplication throughout the experiment, with no significant difference between time points ($p>0.05$). The effect of treatments at each time point and compared to the basal control group (G1 and G7), a similar behavior was observed for both bacteria in the first hour of incubation, with a reduction in bacterial multiplication in the groups treated only with WBC (G5 = -2.86x; G11 = -8.79x), followed by treatment with PRP (G4 = -1.69x; G10 = -3.96x), a fact observed in the second hour of incubation, but with reduced bacterial multiplication in G5 (-1.07x) and G11 (-2.36x), and an intense reduction in the PRP group only for MSSA (G10 = -8.03x), a fact not observed for MRSA (G5 = 1.33x). Interestingly, the isolated platelets stimulated bacterial multiplication both in the first hour of incubation (G6 = 1.53x; G12 = 1.24x) and in the second hour (G12 = 1.50x), with the exception of G6 (-1.16x). This effect may be due to physical platelet:leukocyte interaction, such as the content of platelet granules and leukocytes. Thus, platelets play an important role in the inhibition/reduction of bacterial multiplication *in vitro* of MRSA and MSSA when in the presence of leukocytes, emphasizing the synergistic interaction, especially in the first moments of exposure to the pathogen.

Keywords: Staphylococci. Bacterial Resistance. Platelet-leukocyte interaction. Platelet content.

LISTA DE SIGLAS

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

β -lactâmicos – Beta-lactâmicos

MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina

α -grânulos – Grânulos alfa

PMPs – Proteínas/peptídeos microbicidas plaquetários

PAMs – Peptídeos antimicrobianos

PRP – Plasma rico em plaquetas

ANOVA – Análise de variância

UFC – Unidades formadoras de colônia

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação

Kg – Quilograma

SRD – Sem raça definida

mL – Mililitro

% – Porcentagem

μ g – Micrograma

\geq – Maior ou igual

mm – Milímetro

$^{\circ}$ C – Graus Celsius

PLT – Contagem total de plaquetas

MPV fL – Volume plaquetário médio

PDW% - Amplitude de distribuição plaquetária

WBC – Contagem total de leucócitos

RBC – Contagem total de eritrócitos

HCT – Volume globular

Hb – Hemoglobina

x – Vezes

mol/L – Mol por litro

g – gramas

μ L – Microlitro

GC – Gluconato de cálcio

PRG – Gel rico em plaquetas

h – Horas

UFC/mL – Unidades formadoras de colônia por mililitro

SST – Solução salina tamponada de fosfatos

rpm – Rotação por minuto

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	13
	ANEXO A- APROVAÇÃO ÉTICA.....	40
	ANEXO B- NORMAS DA REVISTA: BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY.....	41

ARTIGO ORIGINAL

Avaliação *in vitro* do efeito bacteriostático do plasma rico em plaquetas (PRP) em *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA) e *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) pelo teste *kill curve assay*

In vitro* evaluation of the bacteriostatic effect of platelet-rich plasma (PRP) on methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by the *kill curve assay

Ana Flávia Soriano Pereira¹, Anderson Magalhães², Cecília Laposy Santarém¹, Rosa Maria Barilli Nogueira¹, Rodrigo Costa da Silva¹

¹Programa Pós-Graduação em Ciência Animal, UNOESTE - Presidente Prudente - Brasil.

²Faculdade de Ciências da Agrária, Curso de Medicina Veterinária, UNOESTE – Presidente Prudente - Brasil.

Correspondência: Rosa Maria Barilli Nogueira, Universidade do Oeste Paulista - Unoeste, Rodovia Raposo Tavares, km 572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente – SP - Brasil. CEP: 19.067-175. Telefone: (18) 3229-2000.

RESUMO

Infecções estafilocócicas apresentam relevância pela frequência e gravidade. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), bactéria gram-positiva, relevante em infecções, tem seu tratamento comprometido devido casos de resistência. Plaquetas, em processos infecciosos e inflamatórios, interagem com o patógeno e são obtidas em maior concentração no plasma rico em plaquetas (PRP), destacando-se pelo uso com propriedades antimicrobianas. Foi avaliado o efeito bacteriostático *in vitro* de plaquetas caninas sobre *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) utilizando-se diferentes compostos e concentrações de plaquetas e leucócitos caninos. Comparou-se o efeito bacteriostático das plaquetas, em 6 grupos experimentais frente MRSA (G1-G6) e MSSA (G7-G12): G1xG7 salina; G2xG8 controle negativo; G3xG9 meio de cultura; G4xG10 PRP; G5xG11 plasma puro rico em plaquetas (P-PRP); G6xG12 leucócitos isolados (WBC). Utilizou-se kill curve assay para avaliar multiplicação bacteriana por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). PRP apresentou taxa de contaminação por leucócitos, não observada no P-PRP, permitindo avaliação individualizada das plaquetas sobre as bactérias. Efeito bacteriostático foi avaliado por kill curve assay, com base na contagem de UFC/mL, em diferentes *time points*. Para ambos, observou-se que leucócitos e interação plaqueta:leucócito induziram redução na multiplicação bacteriana. Analisando o efeito dos tratamentos, observou-se comportamento similar para ambos na 1ª hora de incubação, com redução da multiplicação bacteriana mais intensa nos grupos tratados somente com WBC, seguido pelo tratamento com PRP, fato observado também na 2ª hora. Plaquetas isoladas estimularam multiplicação bacteriana tanto na primeira hora de incubação, quanto na segunda, o que pode ser devido interação física plaqueta:leucócito e conteúdo dos grânulos plaquetários e leucócitos. Assim, plaquetas desempenham papel importante na inibição/redução da multiplicação bacteriana *in vitro* de MRSA e MSSA quando na presença de leucócitos, enfatizando interação sinérgica principalmente nos primeiros momentos de exposição ao patógeno.

Palavras chaves: Estafilococos. Resistência bacteriana. Interação plaqueta-leucócito. Conteúdo Plaquetário.

1. INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é a capacidade dos microrganismos de resistir ao efeito dos medicamentos (antibióticos), uma ameaça séria que vem aumentando constantemente e se tornando um crescente problema de saúde no mundo todo, gerando profundas implicações para a saúde pública. Na fase em que nos encontramos atualmente, até infecções simples se tornam intratáveis e, com isso, o surgimento de cepas resistentes tem seu crescimento acelerado [1]. A pesquisa neste campo está focada em encontrar novos agentes e estratégias para combater infecções e reduzir o tempo de tratamento [2].

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é um dos mais importantes e letais patógenos bacterianos identificados desde o início do século XX. Bactéria gram-positiva, clinicamente relevante, sendo o isolado bacteriano mais comumente observado em várias infecções e associado a maiores taxas de falha do tratamento, devido a capacidade de formar biofilmes [3-5]. Por definição prática, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) apresenta resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos (β -lactâmicos) enquanto *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA) apresenta sensibilidade a esta classe de antibióticos [6]. A primeira linha de escolha para o tratamento de infecções complicadas por MRSA é o antibiótico vancomicina, porém devido aos seus efeitos colaterais buscam-se novas alternativas para terapias eficazes e seguras [7].

As plaquetas, como já observado na literatura, desempenham papel fundamental na defesa do hospedeiro contra a infecções [8]. Elas têm a capacidade de liberar proteínas e fatores de crescimento e, segundo descobertas mais recentes, também podem liberar agentes imunomoduladores com atividade antimicrobiana [9-10]. Estes fragmentos dos megacariócitos (células precursoras das plaquetas e presentes na medula óssea) interagem com o patógeno e células inflamatórias, acumulando-se no local do dano endotelial causado pela colonização microbiana e desempenhando papel defensivo natural na luta contra as infecções. As plaquetas possuem diversas organelas e vacúolos no seu interior, dentre eles os grânulos alfa (α -grânulos) e grânulos denso. Dentre estes, os grânulos alfa são ricos em fatores de crescimento e citocinas, se destacam por estimular a resposta inflamatória, recrutando células do sistema imunológico para o local da lesão para atacar os patógenos. Quando expostas às bactérias, as plaquetas participam da co-adesão bacteriana, resultando no sequestro bacteriano e na fagocitose das bactérias. Também auxiliam os neutrófilos na criação de interações célula-célula

com células endoteliais e leucócitos. Desta forma, participam da resposta imune inata do organismo. Os grânulos alfa também contêm moléculas conhecidas como proteínas/peptídeos microbicidas plaquetários (PMPs), que, quando liberados, têm um efeito antimicrobiano [11-14].

As PMPs são consideradas a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores, pois suas moléculas liberadas após a ativação plaquetária são capazes de recrutar células e modular múltiplos processos fisiológicos [15-16]. Outra classe muito promissora para o tratamento são os peptídeos antimicrobianos (PAMs), compostos de aminoácidos produzidos pelas classes de organismos multicelulares como parte da resposta imune nata. Também exercem atividade inibidora intracelular. A vantagem é que são menos propensos a induzir resistência por possuírem múltiplos alvos e raramente interagem com um receptor específico [1-17]. Olhar para os vários concentrados de plaquetas apenas como um agente antimicrobiano limitaria seu uso. Eles devem ser vistos como agentes com efeitos regenerativos e antimicrobianos e assim, podem ser designados como um dos melhores tratamentos para infecções complicadas [9].

As plaquetas podem ser trabalhadas externamente ao organismo de modo a explorar suas atividades e substâncias. Para tal, atualmente compostos ricos em plaquetas (plasma rico em plaquetas-PRP) têm sido obtido mediante diversos protocolos para diferentes espécies. O PRP é uma porção do plasma autólogo e possui uma concentração de plaquetas acima da linha basal, sendo assim rico em fatores de crescimento e citocinas que estão envolvidos em uma resposta inflamatória [3-11-18]. Com isso, o tratamento com o PRP, pode gerar então efeito antimicrobiano, também [11]. Atualmente o PRP vem sendo cada vez mais utilizado em múltiplas aplicações clínicas, mostrando resultados promissores principalmente em regeneração tecidual [19-20]. Pode ser utilizado também como biomaterial, e foi aplicado pela primeira vez como uma "cola" em cirurgias na década de 1970 (essencialmente idêntico ao da cola de fibrina atual) [21]. O PRP pode funcionar então como um complemento à terapia antibiótica convencional ou como uma alternativa devido ao risco potencialmente menor de resistência aos medicamentos [15-22].

Além das plaquetas, outras células encontradas no PRP também podem contribuir para um efeito antimicrobiano, como os leucócitos, a composição pode ser alterada para incluir mais ou menos determinada células específicas durante o processamento [2-11]. Alguns estudos com PRP rico em leucócitos mostram que a

resposta antibacteriana pode ser mais significativa, possivelmente devido à agregação leucócito-plaquetas causando um aumento da resposta inflamatória [19-23].

Apesar do grande potencial de aplicabilidade, o uso terapêutico do PRP como uma alternativa clínica tornou-se difícil, devido à falta de estudos relacionados com a padronização das técnicas e/ou insuficiente descrição dos procedimentos adotados, e a possibilidade de incluir diferentes concentrações de substâncias dificulta as conclusões de como se dá suas propriedades antibacterianas [15-24]. Por essas razões e observações, hipotetizamos que, além de suas propriedades promotoras de cura, pode possuir propriedades antimicrobianas. Ao utilizá-lo como agente bacteriostático temos a vantagem de o mesmo apresentar menor potencial de desenvolver resistência bacteriana em comparação com antibioticoterapia convencional.

Frente a hipótese de que o uso do PRP pode ser um tratamento alternativo a infecções complicadas por MSSA e MRSA, as plaquetas são as responsáveis pelo efeito bacteriostático do PRP frente a bactéria *S. aureus*, o presente estudo objetivou avaliar o efeito bacteriostático *in vitro* de plaquetas caninas em *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA) por meio do teste kill curve assay utilizando diferentes compostos contendo concentrações diferentes de plaquetas e leucócitos caninos.

2. MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados nos laboratórios do Hospital Veterinário, da Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade do Oeste Paulista-Unoeste. As coletas de sangue foram realizadas nas dependências do canil do Hospital Veterinário, foram feitas duas coletas com intervalo de tempo de 30 dias. O processamento das amostras de sangue, hemograma, contagem de células e plaquetas, e processamento das suspensões utilizadas como tratamento no presente projeto foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas. O processamento das amostras microbiológicas e exposição dos tratamentos às bactérias utilizadas no estudo foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Veterinária.

2.1 Delineamento amostral

Todos os experimentos foram realizados utilizando um desenho experimental controlado randomizado em bloco. O tamanho amostral proposto no presente estudo foi calculado utilizando-se o método de equação de recursos (resource

equation) com base na lei dos rendimentos decrescentes (law of diminishing returns), descrito por Festing [25]. Resumidamente, o tamanho amostral apropriado foi determinado pelo número de graus de liberdade para o erro na análise de variância (ANOVA) ou teste t, utilizando a fórmula: $E = N - T - B$, onde E, N, T, e B correspondem ao erro, total de observações, tratamentos e blocos (replicatas) utilizados no ANOVA, respectivamente. Para este cálculo, o possível erro, E, deve estar entre 10 e 20. Assim, considerando cada tubo utilizando o teste kill curve assay como uma unidade experimental e cada tratamento (PRP, WBC, P-PRP, e os três controles) sendo realizado em duplicata, onde cada replicata da duplicata foi plaqueada somente uma vez nas diluições 10-1 e 10-2, foi necessária a repetição do experimento duas vezes (portanto, duas replicatas ou dois blocos), com cada diferente momento de avaliação (time points) considerado como um momento de unidade experimental. Foi realizada a leitura somente da diluição que apresentou menor quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC), porém acima de 30 UFCs. Assim, o cálculo com duas replicatas é: $E = 18 - 5 - 1 = 12$ (para cada bactéria), porque foram 18 observações totais (uma em cada *timepoint*), seis tratamentos, e dois blocos, para cada bactéria testada.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA), da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), sob o protocolo no 5969 (em anexo).

2.2 Animais

Dois animais, da espécie canina (*Canis familiaris*), uma fêmea e um macho, adultos, acima de 25Kg, sem raça definida (SRD), hígidos, mantidos sob cuidados médico veterinário no canil do Hospital Veterinário da Unoeste, foram selecionados e utilizados para as coletas de sangue, após jejum de 12 horas, durante o projeto. Os critérios de inclusão foram, ausência de exposição a qualquer tipo de medicação ou vacinação por até dois meses antes do experimento, alimentação controlada com ração comercial, ausência de doenças hematológicas desde o nascimento, resultado negativo para pesquisa de hematozoários. O estado de saúde destes animais foi confirmado através de exames físicos e rotina de triagem sanguínea, com hemograma completo, incluindo pesquisa de hematozoários, além de bioquímica sérica no Analisador Bioquímico Cobas CIII (Roche, Brasil).

Para o experimento em si, amostras de sangue foram coletadas em 12 tubos vacutainer de 4 mL contendo anticoagulante citrato de sódio 3,2% (obtenção de

PRP, WBC e P-PRP) um tubo vacutainer contendo anticoagulante EDTA (hemograma e contagem basal de plaquetas), e um tubo vacutainer seco (triagem para o estado de saúde), a partir da punção da veia jugular (10-20 mL). As amostras foram coletadas somente no momento do processamento e homogeneizadas por inversão, por meio de vacutainer, para se evitar alteração nos testes hematológicos, além de ativação e agregação plaquetária. Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Análises Clínicas, do Hospital Veterinário, Unoeste, previamente ao momento da exposição às bactérias.

2.3 Cepas bacterianas

Foram utilizadas duas cepas da bactéria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), isoladas de amostras clínicas na rotina do Laboratório de Microbiobiologia Veterinária, do Hospital Veterinário, da Faculdade de Ciências Agrárias, Unoeste, após classificação morfológica e bioquímica, e mantidas refrigeradas em estoque no laboratório. As cepas apresentaram resultados positivo para catalase, DNase e coagulase, resultado negativo para D-teste, além de resistência ao antimicrobiano polimixina B 300µg. Adicionalmente, ambas as cepas foram testadas para resistência/sensibilidade a meticilina (β-lactâmicos) mediante a exposição da bactéria ao antimicrobiano cefoxitina 30µg em teste de disco difusão, sendo então classificadas como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) quando presente halo de inibição ≥ 22 mm, ou *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA) quando presente halo de inibição < 22 mm, de acordo com o Manual de teste de sensibilidade a antimicrobianos do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI/2019) [26].

Ambas as cepas bacterianas foram mantidas em estoque, congeladas, no laboratório. Ao iniciar o projeto, foram semeadas em meio de cultura ágar sangue ovino 5% (BPA-5%) e incubadas a 37°C, 24-48 horas, em estufa de cultura bacteriológica ECB-2 (Olidef, Brasil). Após crescimento, realizou-se novo antibiograma, testando-se diferentes princípios ativos β-lactâmicos para confirmação. Uma vez confirmados os perfis MRSA e MSSA, ocorreu o início das coletas de sangue para o desenvolvimento do estudo. Todos os procedimentos microbiológicos foram realizados no interior de Capela Fluxo Laminar 410 (Pachane, Brasil) e ao redor de bico de Bunsen.

2.4 Obtenção de PRP, P-PRP e WBC

Hemograma do animal foi realizado previamente no início do experimento, utilizando-se contador automático Sysmex Poch Diff 100iV-Roche (Sysmex do Brasil, Brasil). Foram determinadas a contagem total de plaquetas (PLT), volume plaquetário médio (MPV fL), amplitude de distribuição plaquetária (PDW%), contagem total de leucócitos (WBC), contagem total de eritrócitos (RBC), volume globular (HCT), e hemoglobina (Hb, fL). A porcentagem de rendimento plaquetário foi calculada pela fórmula: [(número de plaquetas na suspensão analisada / número de plaquetas no sangue total) x 100]. Previamente ao experimento, um piloto foi realizado para validar a contagem plaquetária no contador automático Sysmex Poch Diff 100iV-Roche com amostras contadas manualmente com hemocítmetro (câmara de Neubauer). Adicionalmente, esfregaço sanguíneo foi realizado a partir da amostra de sangue coletada em vacutainer contendo EDTA para determinação dos valores absolutos de cada população leucocitária, confirmação da ausência de hemoparasitas, além da confirmação de ausência de agregados plaquetários. As lâminas foram coradas em corante panótico rápido (Laborclin, Brasil) e visualizadas em microscópio binocular Eclipse E200 (Nikon, Brasil). Este procedimento foi realizado posteriormente em outras etapas do protocolo de obtenção de PRP, P-PRP e WBC para confirmação de ausência de agregação plaquetária.

2.4.1 Plasma rico em plaquetas (PRP)

A obtenção de PRP foi realizada após adaptação do protocolo descrito por Vendramin et al. [27]. Amostras de sangue total foram coletadas em tubo contendo anticoagulante citrato de sódio tamponado 3,2% (0,109 mol/L). Os tubos foram centrifugados inicialmente a 200 x g em centrífuga Excelsa Baby 206R, durante 10 minutos, para formação de dois níveis: um superior (sobrenadante) turvo levemente amarelado e um sedimento avermelhado. Toda a fração correspondente ao plasma (sobrenadante), mais 200 µL da fração vermelha, foi transferida para um novo tubo de centrífuga cônico de 15-mL, esterilizado, e novamente centrifugado a 200 x g por 10 minutos. Nesta etapa, formou-se dois níveis distintos: um superior (sobrenadante) turvo levemente amarelado e um sedimento avermelhado. Todo sobrenadante amarelado foi separado em novo tubo de centrífuga cônico de 15-mL, esterilizado, para posterior utilização no experimento. Esta fração foi considerada o PRP. Uma pequena alíquota foi retirada para realização de nova contagem de plaquetas, eritrócitos e leucócitos

automatizada, assim como determinação de agregados plaquetários em esfregaço sanguíneo corado pelo corante panótico rápido. O PRP foi separado para utilização nos experimentos.

2.4.2 Plasma rico em plaquetas puro (P-PRP)

A obtenção de P-PRP foi realizada após adaptação do protocolo descrito por Vendramin et al. [27] e Mariani et al. [28]. Amostras de sangue total foram coletadas em tubo contendo anticoagulante citrato de sódio tamponado 3,2% (0,109 mol/L). Os tubos foram centrifugados inicialmente a 200 x g em centrífuga Excelsa Baby 206R, durante 10 minutos, para formação de dois níveis: um superior (sobrenadante) turvo levemente amarelado e um sedimento avermelhado. Toda a fração correspondente ao plasma (sobrenadante), mais 200 µL da fração vermelha, foi transferida para um novo tubo de centrífuga cônico de 15-mL, esterilizado, e centrifugado a 400 x g por 10 minutos. Nesta etapa, formou-se uma suspensão sobrenadante turva com coloração levemente esbranquiçada e um sedimento em forma de “botão de fundo” avermelhado. Todo sobrenadante esbranquiçado foi separado em novo tubo de centrífuga cônico de 15-mL, esterilizado, e centrifugado a 643 x g por 10 minutos. Nesta etapa, formou-se um sobrenadante límpido e um sedimento levemente esbranquiçado turvo, contendo as plaquetas. Todo o sobrenadante foi retirado, e o sedimento ressuspendido no próprio sobrenadante removido de modo a se obter a concentração necessária para utilização em todos os respectivos grupos no desafio as bactérias. Esta fração foi considerada o P-PRP. Uma pequena alíquota foi retirada para realização de nova contagem de plaquetas, eritrócitos e leucócitos automatizada, com o objetivo de se verificar a concentração da suspensão em relação a concentração inicial. O P-PRP foi separado para utilização nos experimentos.

2.4.3 Leucócitos isolados (White blood cells, WBC)

A obtenção de leucócitos isolados (WBC) foi realizada juntamente com o protocolo de obtenção de PRP e, assim, adaptado do protocolo descrito por Vendramin et al. [27]. Desta forma, as amostras de sangue total foram coletadas em tubo contendo anticoagulante citrato de sódio tamponado 3,2% (0,109 mol/L), como para PRP. Os tubos foram centrifugados inicialmente a 200 x g em centrífuga Excelsa Baby 206R, durante 10 minutos, para formação de dois níveis: um superior (sobrenadante) turvo

levemente amarelado e um sedimento avermelhado. Toda a fração correspondente ao plasma (sobrenadante), mais 200 μL da fração vermelha, foi transferida para um novo tubo de centrífuga cônico de 15-mL, esterilizado, e novamente centrifugado a 200 x g por 10 minutos. Nesta etapa, formou-se dois níveis distintos: um superior (sobrenadante) turvo levemente amarelado e um sedimento avermelhado. Todo sobrenadante amarelado foi separado em novo tubo de centrífuga cônico de 15-mL, esterilizado, para posterior utilização no experimento. Para se obter somente WBC, esta suspensão foi induzida a ativação e agregação plaquetária pela agitação forçada em agitador de tubos. A suspensão foi centrifugada a 2000 x g, desprezado o sobrenadante e o sedimento ressuspendido em solução fisiológica 0,9% estéril. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Esta fração foi determinada como WBC. Uma pequena alíquota foi retirada para realização de nova contagem de plaquetas, eritrócitos e leucócitos automatizada, assim como identificação de plaquetas e leucócitos em esfregaço sanguíneo corado pelo corante panótico rápido. Deste modo, foi obtido a suspensão WBC com alto grau de pureza. O WBC foi separado para utilização nos experimentos.

2.5 Ativação plaquetária

A ativação plaquetária foi realizada após adaptação do protocolo descrito por Vendramin et al. [27] e Li [3] nos microtubos utilizados no momento do experimento. Adicionou-se 1 parte de gluconato de cálcio (GC) 10% (9,3 mg/mL) para 4 partes de cada uma das suspensões PRP, WBC, e P-PRP (proporção de 1:4) para induzir a ativação plaquetária e produzir gel (coágulo) rico em plaquetas (PRG) nas três suspensões (Quadro 1). Os volumes foram descritos em proporções visto que as concentrações de plaquetas (PRP e P-PRP) leucócitos (WBC) foram determinadas com base nas quantidades recuperadas. Assim, diferenças foram observadas entre as repetições. Incubou-se as três suspensões a 37°C por 3 h para estimular a liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários..

2.6 Teste de *kill curve assay* (contagem de UFC/mL em placa de Petri)

O protocolo experimental de *kill curve assay* foi realizado de acordo com o proposto por Li [21]. Após crescimento overnight da bactéria *S. aureus* (MRSA e MSSA, em experimentos separados) em placa contendo meio de cultura ágar sangue ovino 5% (BPA-5%), foram adicionadas várias colônias bacterianas em 5 mL de caldo

Mueller-Hinton (MHB), a fim de se obter uma suspensão bacteriana, para cada bactéria, com densidade 0,5 na escala de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL). O tubo foi homogeneizado vigorosamente em vortex e incubado a 37°C, 2h. A partir deste tubo, preparou-se uma diluição de 100x deste inóculo, utilizando-se solução salina tamponada de fosfatos (SST) para se obter a concentração de 1×10^6 UFC/mL. O inóculo foi mantido em gelo até o momento da inoculação nos tubos do experimento.

Microtubos 2,5 mL, esterilizados, com tampa, foram identificados de acordo com o quadro 1, e ensaiados como segue os mesmos quadros, respectivamente para cada bactéria, para um volume de 2 mL em cada tubo.

Primeiramente, foram adicionados PRP, WBC, P-PRP, ou SST aos respectivos microtubos, seguido da solução de ativação plaquetária (gluconato de cálcio, GC-10%) para ativação (formação de gel). Os microtubos foram incubados a 37°C com agitação orbital a 150 rpm em Agitador de Tubos de Ensaio 251 (Fanem, Brasil) para ativação plaquetária. Após, adicionou-se a MHB e, então, o inóculo bacteriano ($1,0 \times 10^6$ UFC/mL) para obter uma concentração final de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL. Após, os tubos foram incubados a 37°C com agitação orbital a 150 rpm em Agitador de Tubos de Ensaio 251 (Fanem, Brasil). Em momentos pré-determinados (*timepoints* 0 h, 1 h, 2 h), homogeneizou-se cada solução, em cada microtubo, por pipetagem repetitiva, pois a bactéria poderia estar presa no interior do gel. Pipetou-se 40 µL de amostra de cada tubo, diluindo-a seriadamente em solução salina estéril 0.9% (diluições 10-1, 10-2). Pipetou-se alíquota de 100 µL de cada diluição em ágar BPA-5%, em triplicata, para contagem de UFC/mL. As culturas foram incubadas a 37°C, overnight, e a contagem de UFC das placas realizada e registrada.

Quadro I - Experimento *kill curve assay* para avaliar a atividade antimicrobiana de PRP, WBC, e P-PRP junto as cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA - G1-G6) e *Staphylococcus aureus* sensível à metilina (MRSA - G7-G12).

ID	Grupos	PRP / WBC / P-PRP	MHB	Bactéria	Suspensão bacteriana
G1A	Controle	-	1500 µL	MRSA	500 µL
G2A	Controle	-	2000 µL		-
G3A	Controle	SST + GC	q.s.p.		500 µL
G4A	PRP*	PRP + GC	q.s.p.		500 µL
G5A	WBC†	WBC + GC	q.s.p.		500 µL
G6A	P-PRP‡	P-PRP + GC	q.s.p.		500 µL
G7A	Controle	-	1500 µL	MSSA	500 µL
G8A	Controle	-	2000 µL		-

G9A	Controle	SST + GC	q.s.p.	500 µL
G10A	PRP*	PRP + GC	q.s.p.	500 µL
G11A	WBC [†]	WBC + GC	q.s.p.	500 µL
G12A	P-PRP [‡]	P-PRP + GC	q.s.p.	500 µL

*q.s.p.: quantidade suficiente para completar 2000 µL

[†] PRP: concentração plaquetária de $2,0 \times 10^6$ plaquetas/µL

[‡] WBC: concentração leucocitária equivalente a contaminação leucocitária do PRP.

[§] P-PRP: concentração plaquetária de $2,0 \times 10^6$ plaquetas/µL

MHB: Mueller-Hinton

2.7 Análise estatística

Todos os dados referentes as contagens de unidades formadoras de colônia (UFC) foram tabulados em planilha Excel. Previamente as análises, foi verificada a distribuição dos dados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (KS) para posterior seleção do melhor teste estatístico. Como os dados apresentaram distribuição normal, determinou-se a média e o erro-padrão da média (EPM) e aplicou-se o teste paramétrico de Análise de Variância para amostras dependentes (ANOVA), com o teste de Tukey para comparações múltiplas como pós-teste, para as análises das contagens de UFC dentro de um mesmo grupo, distribuídas nos três momentos analisados. Quando analisado o mesmo momento entre grupos diferentes, aplicou-se o teste ANOVA para amostras independentes. Para as comparações entre dois momentos pertencentes ao mesmo grupo, aplicou-se o teste t de Student (pareado), enquanto o teste t de Student (não pareado) foi aplicado para comparações a cada dois momentos pertencentes a grupos diferentes.

A redução ou aumento da multiplicação bacteriana nos *timepoints* 1 h e 2 h foi analisada com base nas médias dos valores obtidos nos *timepoints* prévios, obtidos respectivamente para cada bactéria, tomando-se como parâmetro basal os grupos controle basal para MRSA (G1) e MSSA (G7).

Para todas as análises considerou-se um nível de significância (α) de 5% [29]. Todas as análises foram realizadas nos programas GraphPad Prism v.5.01 e GraphPad InStat v.3.06 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, EUA).

3. RESULTADOS

Ao se avaliar o rendimento plaquetário pelas concentrações de plaquetas obtidas no PRP e P-PRP em relação àquela observada ao hemograma, verificou-se que o PRP rendeu uma média de 1,85x plaquetas a mais, enquanto 1,18x foi observada no P-PRP. Em termos absolutos, com base nos valores obtidos ao hemograma e mediante a quantidade de tubos coletados de cada animal para cada procedimento e volume de

sangue obtido, verificou-se que no PRP foi recuperada 15,42% das plaquetas que estavam nos tubos coletados, enquanto no P-PRP esse valor foi ligeiramente inferior (14,92%). A quantidade de plaquetas obtida no P-PRP foi 96,94% o valor obtido no PRP.

Ao se avaliar o grau de contaminação do PRP e P-PRP por leucócitos e eritrócitos, observou-se uma relação média de leucócitos:plaquetas de 1:12,59 e de eritrócitos:plaquetas de 21,25:1, enquanto no P-PRP não foi observada a presença de leucócitos, porém observou-se relação média de eritrócitos:plaquetas de 1:62,01.

Os resultados de média e erro-padrão da média para os grupos experimentais onde a bactéria MRSA foi desafiada aos diferentes protocolos de tratamento com plaquetas caninas em três diferentes momentos podem ser observados na Tabela 1 e na Figura 1. O único grupo referente a MRSA não plotado na figura, não presente na tabela e não analisado na estatística foi o G2 (controle negativo), pois não apresentou nenhum crescimento bacteriano.

Tabela I. Média e erro-padrão da média (EPM) para os grupos experimentais desafiados com a bactéria *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e submetidos ao tratamento com plaquetas caninas em três diferentes momentos. Presidente Prudente, 2021.

Momentos	Grupos experimentais										Valor de p
	G1		G3		G4		G5		G6		
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	
0 hora	949,00 ^{Aa}	49,54	1103,17 ^{Aab}	59,58	966,00 ^{Aab}	98,54	1128,67 ^{Aab}	72,56	1245,50 ^{Ab}	63,59	0,0368
1 hora	2713,00 ^{Ba}	275,54	4659,33 ^{Bb}	31,32	1704,50 ^{ABa}	479,95	1484,00 ^{Aa}	332,14	4785,33 ^{Bb}	232,15	<0.0001
2 horas	6246,00 ^{Ca}	112,88	11372,00 ^{Ca}	78,08	4007,40 ^{Bb}	1364,17	3066,00 ^{Ab}	972,74	10166,00 ^{Ca}	630,00	0,0004
Valore de p	< 0,0001		< 0,0001		0,0354		0,0799		< 0,0001		

Estatística: para um mesmo grupo experimental, médias de contagens de unidades formadoras de colônia (UFC) seguidas de letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os momentos analisados (*timepoints*), pela Análise de Variância para amostras dependentes, comparados pelo Teste de Tukey, enquanto que para um mesmo momento analisado, médias de contagens seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais para aquele dado momento, pela Análise de Variância para amostras independentes, comparados pelo Teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 5%.

Legenda: EPM, erro-padrão da média; p, valor de p para $\alpha = 0,05$.

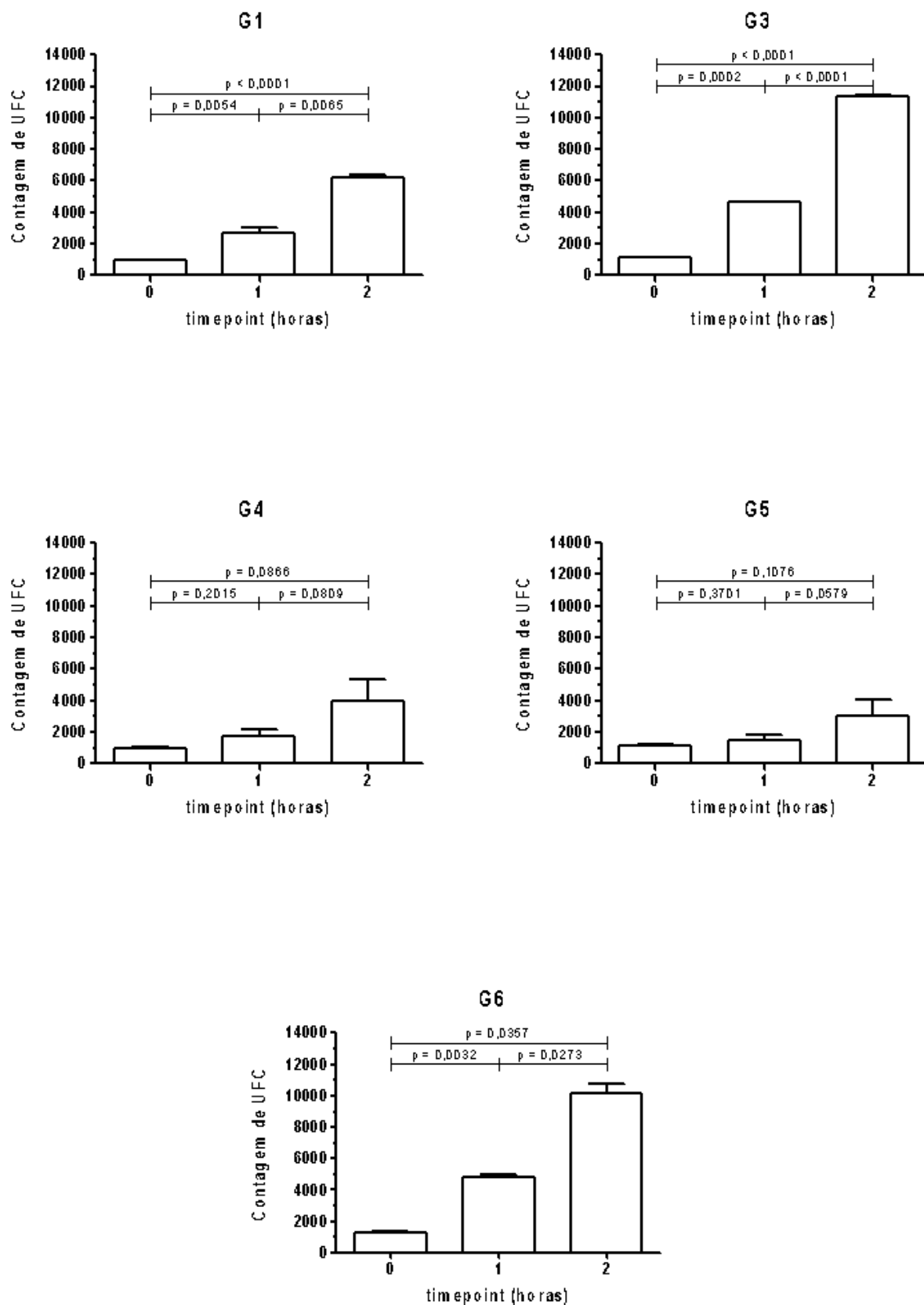


Figura I. Média e erro-padrão médio das concentrações de MRSA (UFC/mL) para os grupos G1-6 nos diferentes momentos de avaliação (*timepoints*).

Comparando-se os grupos experimentais, com ou sem tratamento com plaquetas, ao grupo controle basal (G1) do experimento com MRSA, a Figura 2 apresenta o efeito redutor ou amplificador das plaquetas e/ou leucócitos sobre a bactéria testada nas primeira e segunda horas testadas. Esta figura apresenta a porcentagem de redução ou amplificação da multiplicação bacteriana e a intensidade desta redução ou amplificação, sempre comparada ao grupo controle basal do experimento para MRSA.

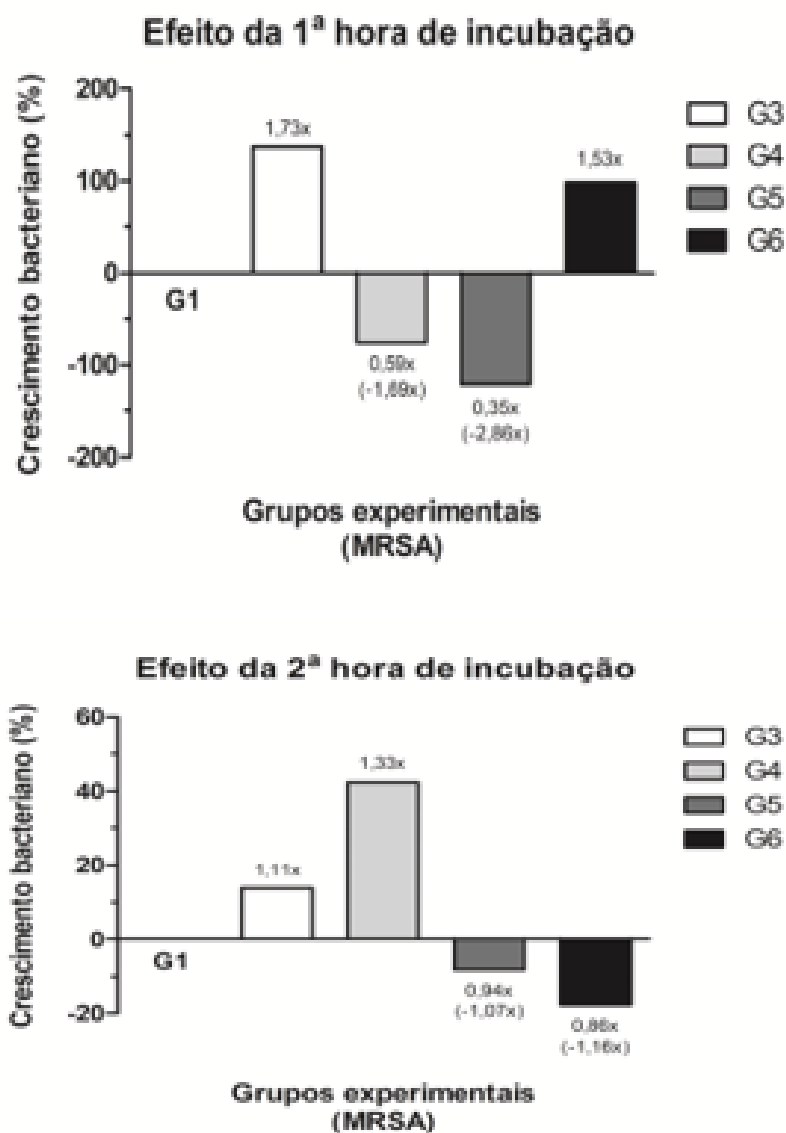


Figura II. Ação dos tratamentos sobre a multiplicação bacteriana nas primeira e segunda horas de incubação para *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA).

Legenda: sem parênteses estão presentes a relação de quantas vezes a porcentagem está em relação ao G1, isto é, em relação 0%. Valores acima de 1,0x indicam estímulo da multiplicação bacteriana, enquanto valores entre 0,0 e 1,0x indicam inibição ou redução da multiplicação bacteriana. Entre parênteses estão os valores inversamente proporcionais aos valores entre 0,0 e 1,0x, sendo os equivalentes de quantas vezes reduz a multiplicação bacteriana em relação ao G1.

Os resultados de média e erro-padrão da média para os grupos experimentais onde a bactéria MSSA foi desafiada aos diferentes protocolos de tratamento com plaquetas caninas em três diferentes momentos podem ser observados na Tabela 2 e na Figura 3. O único grupo referente a MSSA não plotado na figura, não presente na tabela e não analisado na estatística foi o G8 (controle negativo), pois não apresentou nenhum crescimento bacteriano.

Tabela II. Média e erro-padrão da média (EPM) para os grupos experimentais desafiados com a bactéria *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA) e submetidos ao tratamento com plaquetas caninas em três diferentes momentos. Presidente Prudente, 2021.

Momentos	Grupos experimentais										Valor de p
	G7		G9		G10		G11		G12		
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	
0 hora	882,33 ^{Aa}	5,36	906,33 ^{Aa}	14,50	849,67 ^{Aa}	11,41	661,00 ^{Ab}	30,62	782,00 ^{Aa}	43,00	0,0003
1 hora	1777,67 ^{Ba}	18,78	2095,00 ^{Bb}	293,86	632,00 ^{Ac}	85,54	636,00 ^{Ac}	87,27	1767,00 ^{Ba}	35,55	<0.0001
2 horas	4074,67 ^{Ca}	247,60	6289,67 ^{Cb}	432,15	719,00 ^{Ac}	84,79	983,67 ^{Ac}	107,42	5189,67 ^{Cab}	367,16	<0.0001
Valore de p	0,0002		< 0,0001		0,2646		0,1042		<0,0001		

Estatística: para um mesmo grupo experimental, médias de contagens de unidades formadoras de colônia (UFC) seguidas de letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os momentos analisados (*timepoints*), pela Análise de Variância para amostras dependentes, utilizando o Teste de Tukey como pós-teste, enquanto que para um mesmo momento analisado, médias de contagens seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais para aquele dado momento, pela Análise de Variância para amostras independentes, também utilizando o Teste de Tukey como pós-teste, considerando-se um nível de significância de 5%.

Legenda: EPM, erro-padrão da média; p, valor de p para $\alpha = 0,05$.

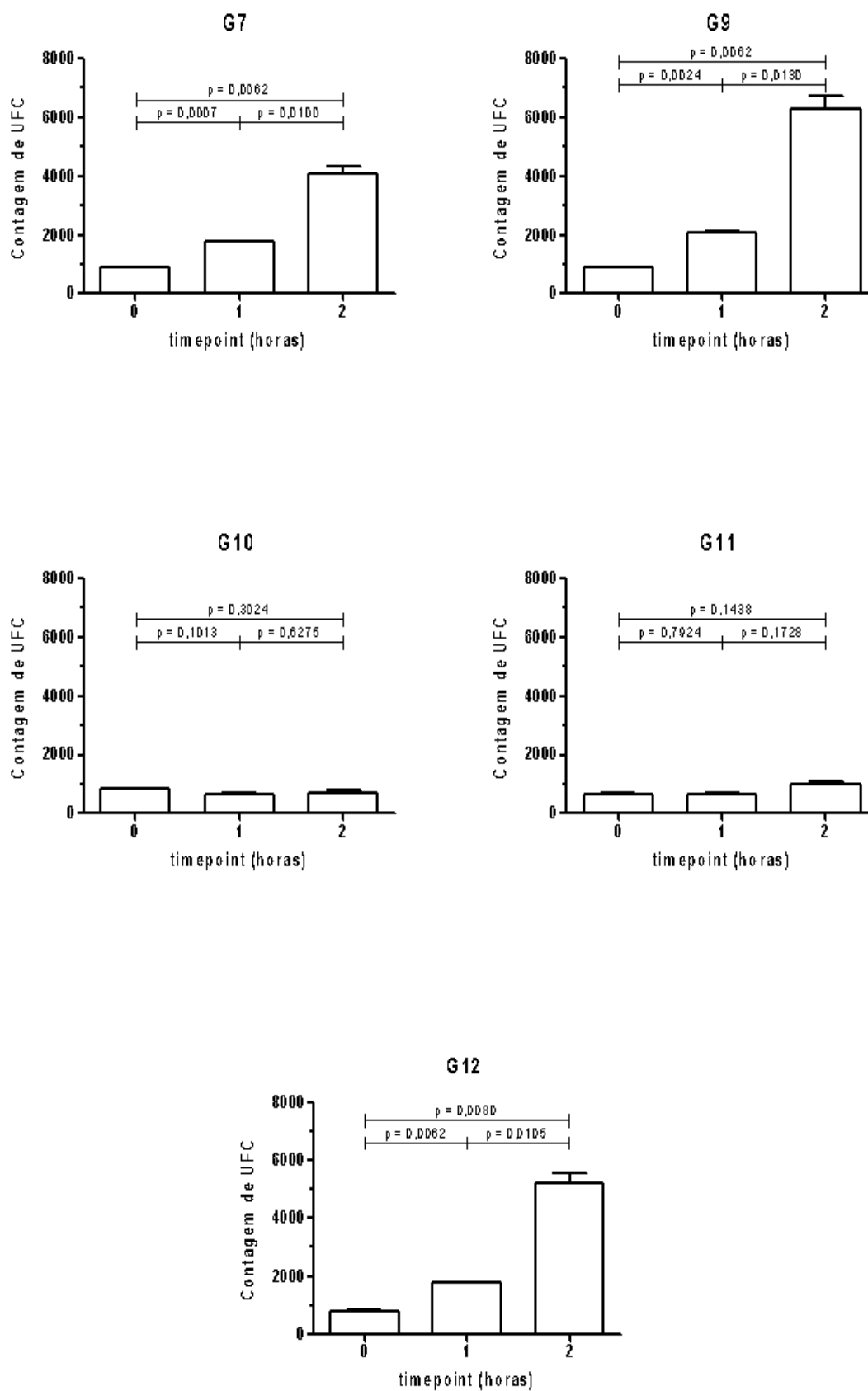


Figura III. Média e erro-padrão médio das concentrações de MSSA (UFC/mL) para os grupos G7-12 nos diferentes momentos de avaliação (*timepoints*).

Comparando-se os grupos experimentais, com ou sem tratamento com plaquetas, ao grupo controle basal (G7) do experimento com MSSA, a Figura 4 apresenta o efeito redutor ou amplificador das plaquetas e/ou leucócitos sobre a bactéria testada nas primeira e segunda horas testadas. Esta figura apresenta a porcentagem de redução ou amplificação da multiplicação bacteriana e a intensidade desta redução ou amplificação, sempre comparada ao grupo controle basal do experimento para MSSA.

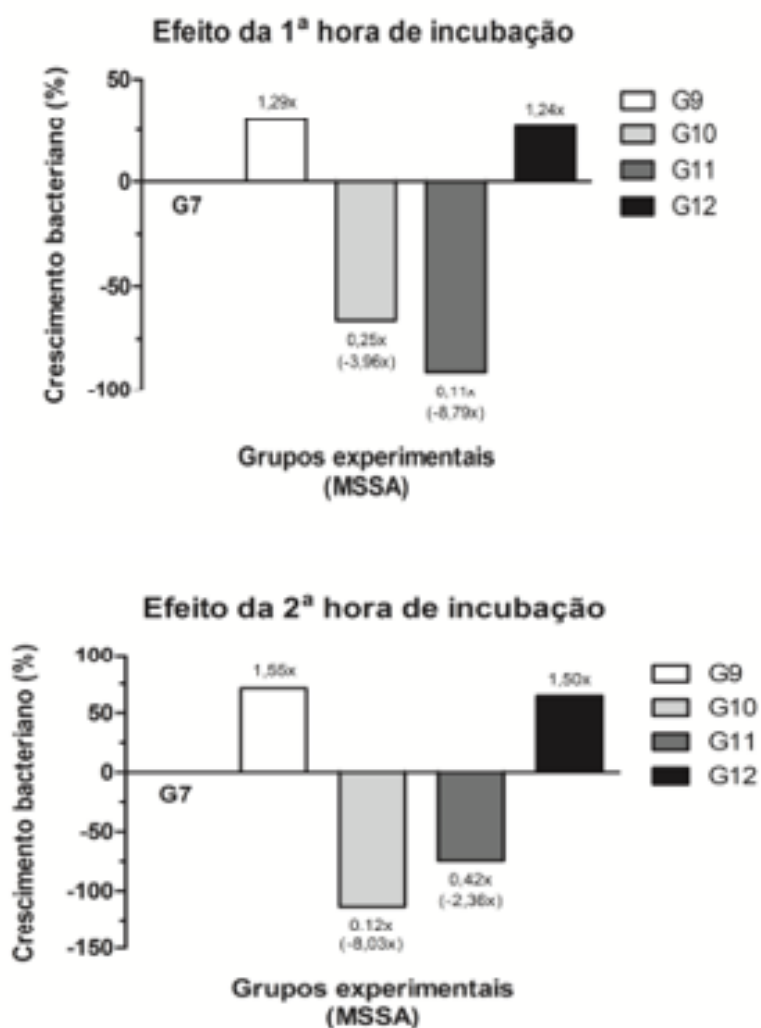


Figura IV. Ação dos tratamentos sobre a multiplicação bacteriana nas primeira e segunda horas de incubação para *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA).

Legenda: sem parênteses estão presentes a relação de quantas vezes a porcentagem está em relação ao G7, isto é, em relação 0%, valores acima de 1,0x indicam estímulo da multiplicação bacteriana, enquanto valores entre 0,0 e 1,0x indicam inibição ou redução da multiplicação bacteriana. Entre parênteses estão os valores inversamente proporcionais aos valores entre 0,0 e 1,0x, sendo os equivalentes de quantas vezes reduz a multiplicação bacteriana em relação ao G7.

4. DISCUSSÃO

Na comparação entre momentos no mesmo grupo houve aumento ($P < 0,05$) no número de UFCs ao longo do tempo de avaliação em todos os grupos, porém sem significância estatística para os grupos G4 ($P = 0,0354$) e G5 ($P = 0,0799$) onde os valores permaneceram semelhantes ao momento 0h até a primeira hora para ambos os grupos e até duas horas para o G5, mostrando neste grupo o efeito máximo na inibição do crescimento de MRSA na primeira hora. Nos diferentes grupos, no *timepoint* 0h houve aumento das UFCs no G6 diferindo significativamente do G1 ($P = 0,0368$); com 1h ($P < 0,0001$) e 2h ($P = 0,0004$) já os grupos G4 (PRP) e G5 (WBC) se mantiveram com valores semelhantes ao controle e significativamente menores em relação aos grupos G3 e G6. Os resultados para os grupos experimentais desafiados com a bactéria *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA) e submetidos ao tratamento com plaquetas caninas em três diferentes momentos, mostram o aumento significativo nas UFCs ao longo do tempo de avaliação em todos os grupos, no entanto, para os grupos G10 ($P = 0,2646$) e G11 ($P = 0,1042$) não houve diferença ao longo do tempo e os menores valores para as UFCs ocorreram na primeira hora para estes dois grupos, sendo valores inferiores aos do momento 0h. Na comparação entre grupos nos diferentes momentos no *timepoint* 0h houve redução das UFCs no grupo G11 (WBC) diferindo significativamente ($P = 0,0003$) dos demais grupos. Com e 1h e 2h a redução ocorreu não só no grupo G11 mas também no grupo G10 diferindo significativamente ($P < 0,0001$) dos demais grupos, desta forma os achados do presente estudo mostram a ação positiva do PRP e WBC como já citado por outros autores [30-32].

Em situações em que existe uma solução de continuidade, que pode ocorrer por diferentes motivos, pode existir comprometimento além da pele, do tecido celular subcutâneo e muscular e em casos de colonização bacteriana destas lesões, o processo de reparação e cicatrização pode ficar prejudicado e retardado. Na literatura existem evidências de que o concentrado de plaquetas, além de efeito regenerativo, tem efeito antimicrobiano por ação direta no reconhecimento, sequestro e neutralização de patógenos invasores e indireta no recrutamento e modulação de leucócitos para locais de infecção proporcionando maior capacidade fagocitária devido as diferentes vias de sinalização, o que pode ajudar o processo de cicatrização [11-20-32-33].

No presente estudo, o efeito bacteriostático sobre a atividade de MRSA e MSSA foi confirmado nos grupos G4, G5 e G10, G11 respectivamente, corroborando outros autores [31-32]. Além disso, foi observado que a concentração leucocitária do PRP foi o que mais interferiu para redução das UFCs, sendo que para MSSA, a inibição foi ainda mais acentuada quando comparado a MRSA, achado relatado por outros autores em situações clínicas de redução de infecção em casos ortopédicos [34], trauma [35], cirurgia maxilo-facial [32] e cardíaca [36].

A redução das UFCs nos grupos G4 e G10 se relacionam com as atividades antimicrobianas das plaquetas, que promovem um papel defensivo natural podendo estar diretamente ligados à presença de leucócitos contidos no biomaterial que pode levar a degranulação das membranas. Os grânulos alfa ricos e fatores de crescimento, citocinas, proteínas/peptídeos microbicidas plaquetários (PMPs) contidos no interior das plaquetas funcionam como quimiocinas, podendo ser usada como terapia complementar na infecção de feridas, uma vez que possui um menor risco de resistência quando comparada aos fármacos ou ajudando para feridas crônicas não infectadas sejam colonizadas [19-37-38].

Apesar de ser observado o efeito bacteriostático do PRP neste estudo, também relatado por Smith et al. [39] frente a *S. aureus* independentemente do PRP estar ativado ou inativado, o maior efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano se deu nos grupos G5 e G11 e estão relacionados ao importante papel dos leucócitos, porém nos grupos G4 e G10 observamos o importante sinergismo das plaquetas com os leucócitos, estes podem ter seu número reduzido ou aumentado durante o processamento do PRP [40], portanto devemos levar em consideração que fatores como diferentes técnicas [41], método de ativação exógena [42] e variabilidade biológica da concentração do fator de crescimento entre os indivíduos [43] podem modificar a composição do PRP e a quantidade de fatores de crescimento disponíveis. Neste estudo, produzimos e utilizamos uma contagem de plaquetas seis vezes maior que a contagem inicial e um aumento de três a cinco vezes nas plaquetas, o que tem sido considerado uma concentração apropriada para aplicações médicas [44].

A agregação leucócito-plaquetas causa uma resposta inflamatória aumentada, disponibilizando um maior número de fator de crescimento para tecidos lesionados comparado com métodos pobres em leucócitos [45], além de promover a liberação de serino-proteases e metaloproteinases (MMP) que controlam a resposta inflamatória, no entanto, também liberam citocinas inflamatórias e espécies reativas de

oxigênio que são prejudiciais durante o tratamento [46-47]. Desta forma, existe uma controvérsia com relação a concentração de leucócitos que seria ideal e em que situação clínica seu uso seria indicado, apesar da confirmação em estudo de revisão sistemática, de que o concentrado de plaquetas possui efeito antimicrobiano [48]. De qualquer forma, sugerimos que outros estudos com diferentes concentrações leucocitárias no PRP sejam realizados para determinar seu envolvimento sobre o efeito bacteriostático e as diferentes formulações sejam testadas *in vivo*.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que as plaquetas desempenham papel importante na inibição/redução sendo potentes moduladoras e efectoras imunológicas na multiplicação bacteriana *in vitro* das bactérias MRSA e MSSA, efeito semelhante também ocorre quando na presença isolada de leucócitos (WBC), porem observamos que ocorre uma interação sinérgica entre plaqueta-leucócitos-patógeno no PRP principalmente nos primeiros momentos de exposição ao patógeno, no entanto o P-PRP estimula o crescimento bacteriano, assim entender os mecanismos envolvidos é fundamental para elaboração de abordagens e protocolos terapêuticos eficazes.

6. AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo incentivo financeiro concedido: “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES

7. REFERÊNCIAS

- [1] Pizzolato-Cezar LR, Okuda-Shinagawa NM, Machini MT (2019) Combinatory therapy antimicrobial peptide-antibiotic to minimize the ongoing rise of resistance. *Front Microbiol* 10:1703. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01703>
- [2] D'asta F, Halstead F, Harrion P, Orlandini SZ, Moiemmen N, Lord J (2018) The contribution of leucocytes to the antimicrobial activity of platelet-rich plasma preparation: A systematic review. *Platelets* 29(1):9-20. <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1317731>
- [3] Li GY, Yin JM, Ding H, Jia WT, Zhang CQ (2013) Efficacy of leukocyte – and platelet-rich plasma gel (L-PRP gel) in treating osteomyelitis in a rabbit model. *J Orthop Res* 31(6):949-56. <https://doi.org/10.1002/jor.22299>
- [4] Goldman L, Auselio D (2010) *Cecil Medicine*. São Paulo.
- [5] Kyany'a C, Nyasinga J, Matano D, Oundo V, Wacira S, Willie S, Musila L (2019) Phenotypic and genotypic characterization of clinical *Sthapylococcus aureus* isolates from Kenya. *BMC Microbiology* 19:245. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1597-1>
- [6] Chang VS, Dhaliwal DK, Raju L, Kowalski RP (2015) Antibiotic resistance in the treatment of *Sthapylococcus aureus* keratitis: a 20-year review. *Cornea* 34(6):698-703. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000431>
- [7] Rosanova MT, Aguilar PS, Sberna N, Lede R (2018) Efficacy and safety of ceftaroline: systematic review and meta-analysis 6:2049936118808655. <https://doi.org/10.1177/2049936118808655>
- [8] Yeaman MR, Bayer AS (1999) Antimicrobial peptides from platelets. *Drug Resist Updat* 2(2):116-126. <https://doi.org/10.1054/drup.1999.0069>
- [9] Varshney S, Dwivedi A, Pandey V (2019) Antimicrobial effects of various platelet rich concentrates-vibes from in-vitro studies-a systematic review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* 9(4):299-305. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2019.06.013>
- [10] Ehrenfest DMD, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T (2014) Classification of platelet concentrates (platelet-rich-plasma-PRP, platelet-rich fibrina-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J* 4(1):3-9.
- [11] Smith OJ, Wicaksana A, Davidson D, Spratt D, Mosahebi A (2021) An evaluation of the bacteriostatic effect of platelet-rich plasma. *International Wound Journal* 1:9. <https://doi.org/10.1111/iwj.13545>
- [12] Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME (2002) Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 70(12):6524-6533. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6524-6533.2002>
- [13] Zang W, Guo Y, Kuss M, Shi W, Aldrich AL, Untrauer J, Kielian T, Duan B (2019) Platelet-rich plasma for the treatment of tissue infection: preparation and clinical evaluation. *Tissue Eng Part B Rev* 25(3):225-236. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2018.0309>

- [14] Bechinger B, Gorr SU (2017) Antimicrobial peptides. *J Dent Res* 96(3):254-260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>
- [15] Cieslik-Bielecka A, Bold T, Ziolkowski G, Pierchala M, Krolikowska A, Reichert P (2018) Antibacterial activity of leukocyte-and platelet-rich plasma: an in vitro study. *Biomed Res Int* 2018:9471723. <https://doi.org/10.1155/2018/9471723>
- [16] Yeaman M (2010) Platelets in defense against bacterial pathogens. *Cell Mol Life Sci* 67(4):525-44. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0210-4>
- [17] Yeaman MR, Tang YQ, Shen AJ, Bayer AS, Selsted ME (1997) Purification and in vitro activities of rabbit platelet microbicidal proteins. *Infect Immun* 65(3):1023-31. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.3.1023-1031.1997>
- [18] Marck RE, Middelkoop E, Breederveld RS (2014) Considerations on the use of platelet-rich plasma, specifically for burn treatment. *J Burn Care Res* 35(3):219-27. <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e31829b334e>
- [19] Li H, Hamza T, Tidwell JE, Clovis N, Li B (2013) Unique antimicrobial effects of platelet-rich plasma and its efficacy as a prophylaxis to prevent implant-associated spinal infection. *Adv Healthc Mater* 2(9):1277-84. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200465>
- [20] Drago L, Bortolin M, Vassena C, Romano CL, Taschieri S, Fabbro MD (2014) Plasma components and platelet activation are essential for the antimicrobial properties of autologous platelet-rich plasma: an in vitro study. *Plos One* 9(9):e107813. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107813.g001>
- [21] Naik B, Karunakar P, Jayadev M, Marshal VR (2013) Role of platelet rich fibrin in wound healing: a critical review. *J Conserv Dent* 16(4):284-93. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.114344>
- [22] Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo AS (2009) Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med* 37(11):2259-72. <https://doi.org/10.1177/0363546509349921>
- [23] Mariani E, Canella V, Berlingeri A, Bielli A, Cattini L, Landini MP, Kon E, Marcacci M, Matteo BD, Filardo G (2015) Leukocyte presence does not increase microbicidal activity of platelet-rich plasma in vitro. *BMC Microbiol* 15:149. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0482-9>
- [24] Wasterlain AS, Braun HJ, Dragoo JL (2012) Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Operative Techniques in Orthopaedics* 22(1):33-42. <https://doi.org/10.1053/j.oto.2011.11.001>
- [25] Festing MFW (2001) Guidelines for the design and statistical analysis of experiments in papers submitted to ATLA. *ATLA* 29:427-446. doi: 10.1177/026119290102900409.
- [26] Manual de teste de sensibilidade a antimicrobianos do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI/2019) (LABORCLIN, 2019).
- [27] Vendramin FS, Franco D, Schamall RF, Franco TR (2010) Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in skin grafts in rabbits. *Rev. Bras. Cir. Plást.* 25(1):4-10. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5199>
- [28] Mariani E, Canella V, Berlingeri A, Bielli A, Cattini L, Landini MP, Kon E, Marcacci M, Matteo BD, Filardo G (2015) Leukocyte presence does not increase microbicidal activity of Platelet-rich Plasma in vitro. *BMC microbiology* 15(1):1-13. doi: 10.1186/s12866-015-0482-9
- [29] Triola MF. Introdução à estatística. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC. 2005. 682p.

- [30] Giraldo CE, Álvarez ME, Carmona JU (2015). Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet Res.* 11(60):1-7. doi: 10.1186/s12917-015-0370-4
- [31] Mariani E, Filard G, Canella V, Berlingeri A, Bielli A, Cattini L, Landini MP, Kon E, Marcacci M, Facchini A (2014). Platelet-rich plasma affects bacterial growth in vitro. *Cytotherapy* 16(9): 1294-304. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.06.003.
- [32] Cieślak-Bielecka A, Glik J, Skowroński R, Bielecki T (2016) Benefit of Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma in Operative Wound Closure in Oral and Maxillofacial Surgery. *BioMed Research International* 2016:7649206. doi: 10.1155/2016/7649206.
- [33] Jenne CN, Kubes P (2015). Platelets in inflammation and infection. *Platelets* 26(4):286-92. doi: 10.3109/09537104.2015.1010441.
- [34] Callaghan JJ, Liu SS, Phruetthiphat, AO (2014). The revision acetabulum--allograft and bone substitutes: vestigial organs for bone deficiency. *The Bone & Joint Journal* 96-B(11 Supple A):70-2. doi: 10.1302/0301-620X.96B11.34452.
- [35] Wang HF, Gao YS, Yuan T, Yu XW, Zhang CQ (2013). Chronic calcaneal osteomyelitis associated with soft-tissue defect could be successfully treated with platelet-rich plasma: a case report. *International Wound Journal* 10(1): 105–109. doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.00951.x.
- [36] Khalafi RS, Bradford DW, Wilson MG (2008). Topical application of autologous blood products during surgical closure following a coronary artery bypass graft. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 34(2):360–364. doi: 10.1016/j.ejcts.2008.04.026.
- [37] Cetinkaya RA, Yenilmez E, Petrone P, Yilmaz S, Bektore B, Simsek B, Atik TK, Ozyurt M, Unlu A (2019). Platelet-rich plasma as an additional therapeutic option for infected wounds with multi-drug resistant bacteria: in vitro antibacterial activity study. *Eur J Trauma Emerg Surg* 45(3):555-565. doi: 10.1007/s00068-018-0957-0.
- [38] Różalski M, Bartłomiej M, Sadowska B, Paszkiewicz M, Więckowska-Szakiel M, Różalska B (2013). Antimicrobial/anti-biofilm activity of expired blood platelets and their released products. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 22(67):321-325. doi: 10.5604/17322693.1046009.
- [39] Smith OJ, Wicaksana A, Davidson D, Spratt D, Mosahebi A (2021) An evaluation of the bacteriostatic effect of platelet-rich plasma. *Int Wound J* 18(4):448-456. doi: 10.1111/iwj.13545
- [40] Perez AG, Lana JFS, Rodrigues AA, Luzo ACM, Belangero WD, Santana MHA (2014). Relevant aspect of centrifugation step in the plaquet -rich plasma. *ISRN Hematology* 2014:176060. doi: 10.1155/2014/176060.
- [41] Weibrich G, Kleis WKG, Streckbein P, Moergel M, Hitzler WE, Hafner G (2012). Comparison of point-of-care methods for preparation of platelet concentrate (platelet-rich plasma). *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 27(4): 762–769.
- [42] Giraldo CE, Lopez C, Alvarez ME, Samudio IJ, Prades M, Carmona JU (2013). Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *Vet. Res.* 9(29): 1-21. doi: 10.1186/1746-6148-9-29.
- [43] Franklin SP, Birdwhistell KE, Strelchik A, Garner BC, Brainard BM (2017). Influence of Cellular Composition and Exogenous Activation on Growth Factor and

- Cytokine Concentrations in Canine Platelet-Rich Plasmas. *Front. Vet. Sci.* 4(40): 1-32. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00040>
- [44] Fontenot RL, Sink CA, Werre SR, Weinstein NM, Dahlgren LA (2012). Simple tube centrifugation for processing platelet-rich plasma in the horse. *Can. Vet. J.* 53(12): 1266–1272.
- [45] Davis VL, Abukabda AB, Radio NM, With-Enderby PA, Clafshenkel WP, Cairone JV, Rutkowski JL (2014). Platelet-Rich Preparations to Improve Healing. Part II: Platelet Activation and Enrichment, Leukocyte Inclusion, and Other Selection Criteria. *Journal of Oral Implantology* 40(4):511–521. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-12-00106.
- [46] Zhou Y, Zhang J, Wu H, Hogan MV, Wang JH (2015). The differential effects of leukocyte-containing and pure platelet-rich plasma (PRP) on tendon stem/progenitor cells - implications of PRP application for the clinical treatment of tendon injuries. *Stem Cell Research & Therapy* 6(1). doi: 10.1186/s13287-015-0172-4
- [47] Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, Kara V, Fortier LA (2012). Platelet-Rich Plasma: A Milieu of Bioactive Factors. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 28(3):429–439. doi: 10.1016/j.arthro.2011.10.018.
- [48] Varshney S, Dwivedi A, Pandey V (2019). Antimicrobial effects of various platelet rich concentrates-vibes from in-vitro studies-a systematic review. *J Oral Biol Craniofac Res.* 9(4):299-305. doi: 10.1016/j.jobcr.2019.06.013.

ANEXO A- APROVAÇÃO ÉTICA

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRO-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 "EFEITO BACTERICIDA DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) EM BACTÉRIAS STAPHYLOCOCCUS AUREUS SENSÍVEL A METICILINA (MSSA) E STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTES A METICILINA (MRSA): ESTUDO IN VITRO UTILIZANDO TESTE KILL CURVE ASSAY", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 5969 e tendo como participante(s) ANA FLAVIA SORIANO FERREIRA (discente), ANDERSON MAGALHAES (discente), CECILIA LAPOSY SANTAREM (docente), RODRIGO COSTA DA SILVA (docente), ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (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 12/02/2020.

Vigência do projeto: 12/2019 a 04/2022.

ANIMAL VIVO

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
c	4	25 quilos	5 anos	F	Caril Unoeste

Presidente Prudente, 24 de Fevereiro de 2020.

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

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

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - CPDI - 18 2228-2070 - cpdi@unoeste.br
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - 18 2228-2070 - cep@unoeste.br
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA - 18 2228-2070 - ceua@unoeste.br

valde este documento em www.unoeste.br seguindo informando o código de segurança 704675081a26a1618036a6904a7c2

ANEXO B- NORMAS PARA AUTORES DA REVISTA: BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY

Type of Articles

The Brazilian Journal of Microbiology accepts submissions of the following article types:

Research Papers: report results of original research, which has not been published elsewhere. **Short communications:** a short communication should report new and significant findings. Submit form is the same way as research paper. They receive the same review, they are not published more rapidly than research paper.

Reviews: Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest.

Letters to the editor: letters to the editor are intended only for comments on final, typeset articles published in the journal (manuscripts posted online are not accepted) and must cite published references to support the writer's argument.

Your manuscript must be written clearly, in comprehensible and linguistically correct English. Manuscripts written in poor English will not be accepted. Please check the section "English Language Support" how to get assistance.

Sections The Brazilian Journal of Microbiology has the following sections (one of them should be selected during the electronic submission process):

Biotechnology and Industrial Microbiology: Biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by bacteria.

Biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by fungi. Molecular aspects of fungal biotechnology.

Molecular aspects of bacterial biotechnology.

Food Microbiology: Applications of microorganisms (bacteria and fungi) for food production. Food borne diseases, food spoilage, and microbial ecology in foods.

Bacterial and Fungal Pathogenesis: The genetic, biochemical, and structural basis of bacterial pathogenesis.

Clinical Microbiology: Studies of medically-important bacteria, fungi and virus.

Environmental Microbiology: Ecology of natural microbial assemblages, microbial diversity of natural environments such as water, soil, sediments and higher organisms.

Microbial interactions. Biodegradation, Bioremediation, and Environmental considerations for genetically engineered microorganisms.

Veterinary Microbiology: Diseases of animals, Control and/or treatment of animals, Animal pathogen diagnostics, and Veterinary or zoonotic pathogens

Fungal and Bacterial Physiology: Biochemistry, biophysics, metabolism, cell structure, stress response, growth, differentiation and other related process.

Bacterial, Fungal and Virus Molecular Biology: Fungal and bacterial genetics, molecular biology, gene regulation, DNA replication and repair, genomics, proteomics, transcriptomics.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions: Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission: Please go to the submission system and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen. Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

Plagiarism prevention with CrossCheck: Springer is a participant of CrossCheck, a multi-publisher plagiarism detection initiative to screen published and submitted content for originality. CrossCheck consists of two products: a database of scholarly publications (CrossCheck) and a web-based tool (iThenticate) to check an authored work against that database. This journal uses the plagiarism tool to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts and your manuscript may be screened upon submission for plagiarism against previously published works.

Authorship Policy: Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories: Conceived of or designed study, Performed research, Analyzed Data, Contributed new methods or models e Wrote the paper.

Editorial Procedure

This journal follows a single-blind reviewing procedure.

Title Page

Please use this template title page for providing the following information. The title page should include: The name(s) of the author(s), A concise and informative title, The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country, A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author e If available, the 16-digit ORCID of the author(s).

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published. For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

When applicable, also include trial registration number and date of registration

When applicable, also include trial registration number, date of registration followed by “retrospectively registered”

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations'.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Funding (information that explains whether and by whom the research was supported)

Conflicts of interest/Competing interests (include appropriate disclosures)

Ethics approval (include appropriate approvals or waivers)

Consent to participate (include appropriate statements)

Consent for publication (include appropriate statements)

Availability of data and material (data transparency)

Code availability (software application or custom code)

Authors' contributions (mandatory: please see more information here)

Text

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific Style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

References

Citation Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

- 1. Negotiation research spans many disciplines [3].
- 2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
- 3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California
Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (Download zip, 4 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer’s LaTeX macro package.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.

- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s). Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

After Acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication. Article processing charges (APCs) vary by journal – view the full list

Benefits:

- **Increased researcher engagement:** Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- **Higher visibility and impact:** In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.

- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

* Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

Open Choice

Funding and Support pages

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Find more about the license agreement

Research Data Policy

A submission to the journal implies that materials described in the manuscript, including all relevant raw data, will be freely available to any researcher wishing to use them for non-commercial purposes, without breaching participant confidentiality.

The journal strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible.

Please see Springer Nature's information on recommended repositories.

List of Repositories

Research Data Policy

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may be used where appropriate.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

DataCite

Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory. Persistent identifiers (such as DOIs and accession numbers) for relevant datasets must be provided in the paper

For the following types of data set, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory.

Data availability

The journal encourages authors to provide a statement of Data availability in their article. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found, including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. Data availability statements can also indicate whether data are available on request from the authors and where no data are available, if appropriate.

Data Availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

1. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]

2. The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
3. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
4. Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
5. All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available:

Data availability statements

Springer Nature provides a research data policy support service for authors and editors, which can be contacted at researchdata@springernature.com.

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

Helpdesk

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).

- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.
- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction: an erratum/correction may be placed with the article; an expression of concern may be placed with the article; or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is maintained on the platform, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author's institution may be informed
- A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully. The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication. The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving human participants, their data or biological material

Ethics approval

When reporting a study that involved human participants, their data or biological material, authors should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee) and certify that the study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or

comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that an independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the reasons for the exemption).

Retrospective ethics approval

If a study has not been granted ethics committee approval prior to commencing, retrospective ethics approval usually cannot be obtained and it may not be possible to consider the manuscript for peer review. The decision on whether to proceed to peer review in such cases is at the Editor's discretion.

Ethics approval for retrospective studies

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethics approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

Ethics approval for case studies

Case reports require ethics approval. Most institutions will have specific policies on this subject. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their institution and seek ethics approval where needed. Authors should be aware to secure informed consent from the individual (or parent or guardian if the participant is a minor or incapable) See also section on Informed Consent.

Cell lines

If human cells are used, authors must declare in the manuscript: what cell lines were used by describing the source of the cell line, including when and from where it was obtained, whether the cell line has recently been authenticated and by what method. If cells were bought from a life science company the following need to be given in the manuscript: name of company (that provided the cells), cell type, number of cell line, and batch of cells.

It is recommended that authors check the NCBI database for misidentification and contamination of human cell lines. This step will alert authors to possible problems with the cell line and may save considerable time and effort.

Further information is available from the International Cell Line Authentication Committee (ICLAC).

Authors should include a statement that confirms that an institutional or independent ethics committee (including the name of the ethics committee) approved the study and that informed consent was obtained from the donor or next of kin.

Research Resource Identifiers (RRID)

Research Resource Identifiers (RRID) are persistent unique identifiers (effectively similar to a DOI) for research resources. This journal encourages authors to adopt RRIDs when reporting key biological resources (antibodies, cell lines, model organisms and tools) in their manuscripts.

Examples:

Organism: *Filip1tm1a(KOMP)Wtsi* RRID:MMRRC_055641-UCD

Cell Line: RST307 cell line RRID:CVCL_C321

Antibody: Luciferase antibody DSHB Cat# LUC-3, RRID:AB_2722109

Plasmid: mRuby3 plasmid RRID:Addgene_104005

Software: ImageJ Version 1.2.4 RRID:SCR_003070

RRIDs are provided by the Resource Identification Portal. Many commonly used research resources already have designated RRIDs. The portal also provides authors links so that they can quickly register a new resource and obtain an RRID.

Clinical Trial Registration

The World Health Organization (WHO) definition of a clinical trial is "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes". The WHO defines health interventions as "A health intervention is an act performed for, with or on behalf of a person or population whose purpose is to assess, improve, maintain, promote or modify health, functioning or health conditions" and a health-related outcome is generally defined as a change in the health of a person or population as a result of an intervention.

To ensure the integrity of the reporting of patient-centered trials, authors must register prospective clinical trials (phase II to IV trials) in suitable publicly available repositories. For example www.clinicaltrials.gov or any of the primary registries that participate in the WHO International Clinical Trials Registry Platform.

The trial registration number (TRN) and date of registration should be included as the last line of the manuscript abstract.

For clinical trials that have not been registered prospectively, authors are encouraged to register retrospectively to ensure the complete publication of all results. The trial registration number (TRN), date of registration and the words 'retrospectively registered' should be included as the last line of the manuscript abstract.

Purely observational trials will not require registration.

Standards of reporting

Springer Nature advocates complete and transparent reporting of biomedical and biological research and research with biological applications. Authors are recommended to adhere to the minimum reporting guidelines hosted by the EQUATOR Network when preparing their manuscript.

Exact requirements may vary depending on the journal; please refer to the journal's Instructions for Authors.

Checklists are available for a number of study designs, including: Randomised trials (CONSORT) and Study protocols (SPIRIT), Observational studies (STROBE), Systematic reviews and meta-analyses (PRISMA) and protocols (Prisma-P), Diagnostic/prognostic studies (STARD) and (TRIPOD), Case reports (CARE), Clinical practice guidelines (AGREE) and (RIGHT), Qualitative research (SRQR) and (COREQ), Animal pre-clinical studies (ARRIVE), Quality improvement studies (SQUIRE), Economic evaluations (CHEERS).

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and included on a title page that is separate from the manuscript with a section entitled "Declarations" when submitting a paper. Having all statements in one place allows for a consistent and unified review of the information by the Editor-in-Chief and/or peer reviewers and may speed up the handling of the paper. Declarations include Funding, Conflicts of interest/competing interests, Ethics approval, Consent, Data and/or Code availability and Authors' contribution statements. Please use the following template title page for providing the statements.

Once and if the paper is accepted for publication, the production department will put the respective statements in a distinctly identified section clearly visible for readers.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

- Provide "Ethics approval" as a heading (see template)

Examples of ethics approval obtained:

- All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of A (No. ...).
- This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date.../No. ...).
- Approval was obtained from the ethics committee of University C. The procedures used in this study adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki.
- The questionnaire and methodology for this study was approved by the Human Research Ethics committee of the University of C (Ethics approval number: ...).

Examples of a retrospective study:

- Ethical approval was waived by the local Ethics Committee of University A in view of the retrospective nature of the study and all the procedures being performed were part of the routine care.
- This research study was conducted retrospectively from data obtained for clinical purposes. We consulted extensively with the IRB of XYZ who determined that our study did not need ethical approval. An IRB official waiver of ethical approval was granted from the IRB of XYZ.
- This retrospective chart review study involving human participants was in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The Human Investigation Committee (IRB) of University B approved this study.

Examples no ethical approval required/exemption granted:

- This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.
- The data reproduced from Article X utilized human tissue that was procured via our Biobank AB, which provides de-identified samples. This study was reviewed and deemed exempt by our XYZ Institutional

Review Board. The BioBank protocols are in accordance with the ethical standards of our institution and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript.

See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. This is especially true concerning images of vulnerable people (e.g. minors, patients, refugees, etc) or the use of images in sensitive contexts. In many instances authors will need to secure written consent before including images.

Identifying details (names, dates of birth, identity numbers, biometrical characteristics (such as facial features, fingerprint, writing style, voice pattern, DNA or other distinguishing characteristic) and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scholarly purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases. Detailed descriptions of individual participants, whether of their whole bodies or of body sections, may lead to disclosure of their identity. Under certain circumstances consent is not required as long as information is anonymized and the submission does not include images that may identify the person.

Informed consent for publication should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

Exceptions where it is not necessary to obtain consent:

- Images such as x rays, laparoscopic images, ultrasound images, brain scans, pathology slides unless there is a concern about identifying information in which case, authors should ensure that consent is obtained.
- Reuse of images: If images are being reused from prior publications, the Publisher will assume that the prior publication obtained the relevant information regarding consent. Authors should provide the appropriate attribution for republished images.

Consent and already available data and/or biologic material

Regardless of whether material is collected from living or dead patients, they (family or guardian if the deceased has not made a pre-mortem decision) must have given prior written consent. The aspect of confidentiality as well as any wishes from the deceased should be respected.

Data protection, confidentiality and privacy

When biological material is donated for or data is generated as part of a research project authors should ensure, as part of the informed consent procedure, that the participants are made what kind of (personal) data will be processed, how it will be used and for what purpose. In case of data acquired via a biobank/biorepository, it is possible they apply a broad consent which allows research participants to consent to a broad range of uses of their data and samples which is regarded by research ethics committees as specific enough to be considered “informed”. However, authors should always check the specific biobank/biorepository policies or any other type of data provider policies (in case of non-bio research) to be sure that this is the case.

Consent to Participate

For all research involving human subjects, freely-given, informed consent to participate in the study must be obtained from participants (or their parent or legal guardian in the case of children under 16) and a statement to this effect should appear in the manuscript. In the case of articles describing human transplantation studies, authors must include a statement declaring that no organs/tissues were obtained from prisoners and must also name the institution(s)/clinic(s)/department(s) via which organs/tissues were obtained. For manuscripts reporting studies involving vulnerable groups where there is the potential for coercion or where consent may not have been fully informed, extra care will be taken by the editor and may be referred to the Springer Nature Research Integrity Group.

Consent to Publish

Individuals may consent to participate in a study, but object to having their data published in a journal article. Authors should make sure to also seek consent from individuals to publish their data prior to submitting their paper to a journal. This is in particular applicable to case studies. A consent to publish form can be found here.

(Download docx, 36 kB)

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and included on a title page that is separate from the manuscript with a section entitled “Declarations” when submitting a paper. Having all statements in one place allows for a consistent and unified review of the information by the Editor-in-Chief and/or peer reviewers and may speed up the handling of the paper. Declarations include Funding, Conflicts of interest/competing interests, Ethics approval, Consent, Data and/or Code availability and Authors’ contribution statements. Please use the template Title Page for providing the statements. Once and if the paper is accepted for publication, the production department will put the respective statements in a distinctly identified section clearly visible for readers. Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

Provide “Consent to participate” as a heading

Sample statements consent to participate:

- Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.
- Informed consent was obtained from legal guardians.
- Written informed consent was obtained from the parents.
- Verbal informed consent was obtained prior to the interview.
- The patient has consented to the submission of the case report for submission to the journal.

Provide “Consent to publish” as a heading

- The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication of the images in Figure(s) 1a, 1b and 1c.
- The participant has consented to the submission of the case report to the journal.
- Patients signed informed consent regarding publishing their data and photographs.
- Sample statements if identifying information about participants is available in the article:
- Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.
- Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.
- If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.
- Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.
- Images will be removed from publication if authors have not obtained informed consent or the paper may be removed and replaced with a notice explaining the reason for removal.

Research involving animals

Experimental research on vertebrates or any regulated invertebrates must comply with institutional, national, or international guidelines, and where available should have been approved by an appropriate ethics committee. The Basel Declaration outlines fundamental principles to adhere to when conducting research in animals and the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) has also published ethical guidelines.

A statement detailing compliance with relevant guidelines (e.g. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and Directive 2010/63/EU in Europe) and/or ethical approval (including the name of the ethics committee and the reference number where appropriate) must be included in the manuscript.

For experimental studies involving client-owned animals, authors must also document informed consent from the client or owner and adherence to a high standard (best practice) of veterinary care. Field studies and other non-experimental research on animals must comply with institutional, national, or international guidelines, and where available should have been approved by an appropriate ethics committee. A statement detailing compliance with relevant guidelines and/or appropriate permissions or licenses must be included in the manuscript. We recommend that authors comply with the IUCN

Policy Statement on Research Involving Species at Risk of Extinction and the Convention on the Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora.

Utilization of plants, algae, fungi

This journal values stewardship, transparency, and adhering to governance with regards to collecting and utilizing specimens and conducting experiments and/or field studies.

Therefore the journal sets out the following guidelines:

Field studies involving genetically engineered plants must be conducted in accordance with national or local legislation and, if applicable, the manuscript needs to include a statement specifying the appropriate permissions and/or licences.

Authors utilizing genetic plant resources received via local suppliers/collectors, such as species collected from protected areas or endangered species with medical importance, must conduct their experiments following the Nagoya Protocol (as part of the Convention on Biological Diversity).

Authors whose research is focusing on quarantine organisms (i.e. harmful or pest organisms, including plant pathogens) should adhere to national legislation and notify the relevant National Plant Protection Organization of new findings before publication. More information can be found via the International Plant Protection Convention.

In principle, it is recommended that authors comply with:

- The International Union for Conservation of Nature (IUCN) Policy Statement on Research Involving Species at Risk of Extinction and consult the IUCN red list index of threatened species
- Convention on the Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

Voucher specimens ensure that the identity of organisms studied in the field or in laboratory experiments can be verified, and ensure that new species concepts can be applied to past research. Voucher specimens documenting all investigated accessions (for population samples at least one specimen per population) are to be deposited in a public herbarium, for example: Index Herbariorum, or other public collection providing access to deposited material. Information on the voucher specimen and who identified it must be included in the manuscript such as Genus name, species name, author, and year of publication.

Names of plants, algae and fungi

Manuscripts containing new taxon names or other nomenclatural acts must follow the guidelines set by the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants. Authors describing new fungal taxa should register the names with a recognized repository, such as Mycobank, and request a unique digital identifier which should be included in the published article.

Authorship Principles

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,
Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt et al, PNAS February 27, 2018

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations. Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

- ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
- managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*
- providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
- making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

Authors must include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For review articles where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the student's dissertation or thesis, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

English Language Support

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.