



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

VALTER DIAS DA SILVA

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DE FERIDAS TRATADAS COM BIOPOLÍMERO
DE QUITOSANA/XANTANA/ β -GLICANA E PLASMA RICO EM PLAQUETAS
AUTÓLOGO (PRPa)**

Presidente Prudente - SP
2023



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

VALTER DIAS DA SILVA

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DE FERIDAS TRATADAS COM BIOPOLÍMERO
DE QUITOSANA/XANTANA/ β -GLICANA E PLASMA RICO EM PLAQUETAS
AUTÓLOGO (PRPa)**

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

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Barilli Nogueira

Presidente Prudente - SP
2023

636.089
S586m

Silva, Valter Dias da.

Morfologia e morfometria de feridas tratadas com biopolímero de quitosana/xantana/ β -glicana e plasma rico em plaquetas autólogo (PRPa) / Valter Dias da Silva.
– Presidente Prudente, 2023.

64 f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal)
- Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2023.

Bibliografia.

Orientador: Rosa Maria Barilli Nogueira

1. Quitosana. 2. Xantana. 3. β -glicana. 4. Cicatrização. 5. PRP. I. Título.

VALTER DIAS DA SILVA

MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DE FERIDAS TRATADAS COM BIOPOLÍMERO DE QUITOSANA/XANTANA/ β -GLICANA E PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO (PRPa)

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

Presidente Prudente, 22 de março de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof^a. Dr^a. Cecília Laposy Santarém
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Rodrigo Costa da Silva
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof^a. Dr^a. Márcia Zilioli Bellini
Centro Universitário de Adamantina – FAI
Adamantina-SP

Prof^a. Dr^a. Karina Basso
Centro Universitário Filadélfia-UNIFIL
Londrina-PR

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho, a minha família;
presença constante em minha vida; fonte de amor, inspiração e apoio
incondicional.*

*Em especial aos meus pais, Luíz Carlos e Marta Dias;
meu alicerce, porto seguro, onde me “abasteço” e me encorajo com “doses” de
sabedoria,
incentivo, amor e confiança plena.*

*Aos amigos “irmãos”
que presentes nos mais diversos momentos de desafios e conquistas,
seguraram minhas mãos, me incentivando a ser melhor sempre.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por minhas conquistas, pelas oportunidades únicas concedidas e desafios que me fazem “crescer” em muitos aspectos.

Aos meus pais, os principais norteadores nos momentos de desafios, celebração de conquistas e disciplina; aqueles que me acompanham com zelo em cada etapa e projetos de vida.

Ao meu irmão e cunhada, que estiveram sempre presentes com gestos e palavras de apoio e carinho.

Aos meus sobrinhos, fonte de inspiração e amor; me incentivam a sonhar “alto” com suas vitalidades e projetos de vida.

A minha orientadora e amiga Rosa Maria Barilli Nogueira, pela oportunidade, de mais uma vez, poder estar ao seu lado, aprendendo que apesar da complexidade dos trabalhos científicos, a vida é simples; e que os melhores momentos são aqueles em que compartilhamos sorrisos frente as adversidades. Obrigado por seu carinho!

A professora e amiga Marcia Zilioli Bellini, que me incentivou a realizar esse trabalho e me instruiu no desenvolvimento das membranas poliméricas.

A professora Cecília Laposy Santarém pelas orientações no desenvolvimento do PRPa e considerações que enriqueceram o trabalho.

As amigas Lidelci e Liliane, pela participação no desenvolvimento do experimento e companheirismo e convivência em cada etapa.

Ao amigo Guilherme Batista do Nascimento pelo auxílio prestado na análise estatística.

Aos docentes e colegas do curso de Pós-Graduação pelos momentos de convivência, experiências e ensinamentos compartilhados.

Aos funcionários do Biotério Central pela disponibilidade e colaboração.

A Universidade do Oeste Paulista, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, pelo apoio financeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES pelo incentivo financeiro enquanto taxista – Código de Financiamento 001.

Ao Centro Universitário de Adamantina, por disponibilizar os laboratórios para o desenvolvimento da membrana polimérica, bem como, pela disponibilidade dos funcionários e colaboração.

A todos que, de alguma maneira, colaboraram direta ou indiretamente para que eu pudesse alcançar essa conquista.

Meu carinho e gratidão.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível”.*

(Charles Chaplin)

RESUMO

Morfologia e morfometria de feridas tratadas com biopolímero de quitosana/xantana/ β -glicana e plasma rico em plaquetas autólogo (PRPa)

Resultados promissores na regeneração de lesões de pele, têm sido demonstrados com o uso de produtos de origem natural (orgânicos), como os curativos dérmicos constituídos de polissacarídeos (quitosana complexada com xantana), por promoverem microambiente hidratado e com isolamento térmico, permitindo as trocas gasosas; e fontes ricas em fatores de crescimento como o plasma rico em plaquetas autólogo (PRPa), que apresenta os fatores de crescimento transformador beta (TGF- β), endotelial vascular (VEGF) e derivado da plaqueta (PDGF), responsáveis pela estimulação da cascata inflamatória e da cicatrização. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de uma membrana polimérica (quitosana, xantana e β -glicana) e do PRPa na cicatrização “*in vivo*”, empregados isoladamente ou associados. Para os testes, coelhos foram submetidos a procedimento cirúrgico para indução da lesão e distribuídos em grupo controle (GC), grupo membrana (GM), grupo PRPa (GPa) e grupo membrana associada ao PRPa (GMPa), sendo avaliados nos momentos M0, M7, M14, M21 e M28 (28 dias). As variáveis cor e exsudação da ferida, presença de infecção e inflamação, formação de tecidos de granulação, cicatricial e necrótico, e análise morfológica e morfométrica foram analisadas. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando o software Software R®, sendo adotado um nível de significância igual a 5%. As diferenças entre os tratamentos no tempo de cicatrização não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$), e as feridas apresentaram 100% de retração no M21; entre os momentos foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$), evidenciando-se que a membrana complexada isolada ou em combinação com PRPa contribui para um ambiente úmido e troca gasosa necessário para a cicatrização, além de atividade antimicrobiana. Da mesma forma no 7º dia de cicatrização que GPa e GMPa contribuíram para um percentual de 29,71% e 21,65% na retração da ferida, respectivamente, enquanto o grupo controle com 16,96%. Do M7 para o M14 diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) foram observadas no percentual de retração das feridas em 55,66%, 54,88%, 38,38% e 40,22% para os grupos GC, GM, GPa e GMPa respectivamente. Conclui-se que PRPa isolado ou associado a membrana podem contribuir de maneira efetiva na cicatrização de feridas cirúrgicas experimentais pois contribuem com percentuais mais significativos de retração nos primeiros 7 dias de tratamento quando comparados aos demais tratamentos, além de propiciar um microambiente adequado a cicatrização.

Palavras-chave: quitosana; xantana; β -glicana; cicatrização; PRPa.

ABSTRACT

Morphology and morphometry of wounds treated with chitosan/xanthan/ β -glycan biopolymer and autologous platelet-rich plasma (PRPa)

Promising results in the regeneration of skin lesions have been demonstrated with the use of products of natural origin (organic), such as dermal dressings made of polysaccharides (chitosan complexed with xanthan), as they promote a hydrated and thermally insulating microenvironment, allowing exchanges gaseous; and sources rich in growth factors such as autologous platelet-rich plasma (PRPa), which contains transforming growth factors beta (TGF- β), vascular endothelial (VEGF) and platelet-derived (PDGF), responsible for stimulating the cascade inflammation and healing. The objective of this work was to evaluate the action of a polymeric membrane (chitosan, xanthan and β -glycan) and PRPa in healing "in vivo", used alone or in combination. For the tests, rabbits underwent a surgical procedure to induce the lesion and were divided into a control group (GC), membrane group (GM), PRPa group (GPa) and membrane group associated with PRPa (GMPa), being evaluated at moments M0, M7, M14, M21 and M28 (28 days). The variables wound color and exudation, presence of infection and inflammation, formation of granulation, scarring and necrotic tissue, and morphological and morphometric analysis were analyzed. Statistical analyzes of the results were performed using the Software R® software, adopting a significance level of 5%. Differences between treatments in healing time were not statistically significant ($p > 0.05$), and wounds showed 100% retraction at M21; significant differences were observed between the moments ($p < 0,05$), showing that the complexed membrane alone or in combination with PRPa contributes to a humid environment and gas exchange necessary for healing, in addition to antimicrobial activity. Likewise, on the 7th day of healing, Gpa and GMPa contributed to a percentage of 29.71% and 21.65% in wound retraction, respectively, while the control group with 16.96%. From M7 to M14 statistically significant differences ($p < 0,05$) were observed in the percentage of wound retraction in 55.66%, 54.88%, 38.38% and 40.22% for groups GC, GM, GPa and GMPa respectively. It is concluded that PRPa alone or associated with a membrane can effectively contribute to the healing of experimental surgical wounds, as they contribute to more significant percentages of retraction in the first 7 days of treatment when compared to other treatments, in addition to providing an adequate microenvironment for healing.

Keywords: chitosan; xanthan; β -glycan; healing; PRPa.

LISTA DE SIGLAS

bFGF	– Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
BRM	– Modificadores da Resposta Biológica
CAPES	– Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	– Comitê de Ética no Uso de Animais
Ch	– Quitosana
CMN	– Células Mononucleares
Decs	– Descritores em Ciências da Saúde
EGFL-7	– Fator de Crescimento Epidérmico-7
EROs	– Espécies Reativas de Oxigênio
GAGs	– Glicosaminoglicanos
GC	– Grupo Controle
GM	– Grupo Membrana
GPa	– Grupo PRPa
GMPa	– Grupo Membrana associada ao PRPa
HA	– Ácido Hialurônico
IL-1 β	– Interleucina-1 Beta
IL-8	– Interleucina-8
IL-10	– Interleucina-10
NAG	– <i>N</i> -Acetilglucosamina
MEC	– Matriz Extracelular
PDGF	– Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PMN	– Células Polimorfonucleares
PPP	– Plasma Pobre em Plaquetas
PRF	– Plasma Rico em Fibrina
PRP	– Plasma Rico em Plaquetas
PRPa	– Plasma Rico em Plaquetas Autólogo
TGF- β	– Fator de Crescimento Transformador Beta
TNF- α	– Fator de Necrose Tumoral Alfa
TGF- β 1	– Fator de Crescimento Transformador Beta 1
WCR	– Taxa de Contração da Ferida
VEGF	– Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

ARTIGO 1	QUITOSANA E PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO (PRPa) NO REPARO TECIDUAL: PROPRIEDADES BIOLÓGICAS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	12
ARTIGO 2	MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DE FERIDAS TRATADAS COM BIOPOLÍMERO DE QUITOSANA/XANTANA/β-GLICANA E PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO (PRPa).....	27
ANEXO A	INSTRUÇÕES PARA AUTORES PARA SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS À REVISTA MEDICINA.....	37
ANEXO B	DIRETRIZES PARA SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS À REVISTA <i>JOURNAL OF BIOMATERIALS APPLICATIONS</i>.....	55
ANEXO C	APROVAÇÃO DO CEUA.....	62
ANEXO D	ESTILO DE REFERÊNCIA SAGE VANCOUVER.....	63



Review

Quitosana e Plasma Rico em Plaquetas Autólogo (PRPa) no Reparo Tecidual: Propriedades Biológicas na Cicatrização de Feridas

Valter Dias da Silva ^{1,*} and Rosa Maria Barilli Nogueira ¹

¹ Departamento de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Rod. Raposo Tavares, km 572 - Limeeiro, 19067-175 1, Presidente Prudente, Brasil

* Correspondence: vrdias@gmail.com

Abstract: Among the promising alternatives in the treatment of wounds currently being studied are chitosan-based biodressings (membranes, hydrogels, ointments, sponges, fibers and others), as in addition to being biocompatible and biodegradable, they are non-toxic and non-allergenic with hemostatic properties; and autologous platelet-rich plasma (PRPa), with the aim of stimulating and accelerating healing; a widely used non-toxic and non-immunoreactive organic product, as it is a rich source of growth factors that contribute to tissue remodeling by stimulating the inflammatory response, angiogenesis, fibroblast proliferation and, consequently, increased collagen synthesis; in addition to its ability to rebuild and regenerate cartilage. The *objective* of this study was to evaluate the biological properties of chitosan and PRPa-based biodressings used in experimental models of wound induction to promote healing, through a review of the scientific literature in databases: Pubmed, Medline, Lilacs and Science Direct, using the following descriptors (Decs): chitosan, healing, Platelet Rich Plasma (PRP) and biodressings. It can be concluded that chitosan, due to its hemostatic, anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial properties, in addition to promoting an environment (with gas exchange and thermal control) suitable for the healing process, contributes to accelerating the process, as well as a regular deposition of collagen, however, the different experimental designs and other factors can lead to confusing interpretations of the results regarding the relationship between chitosan and healing. Some studies with PRPa show promising results in the rate of wound closure, and mainly by primary hemostatic action and promotion of neovascularization (angiogenesis and vasculogenesis), in addition to presenting antimicrobial activity. Studies using biomaterials deserve attention in the experimental designs of future research.

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname
Lastname

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date

Keywords: chitosan; healing; platelet rich plasma; biological dressings.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introdução

A reparação do tecido lesado por feridas agudas acontece por um processo complexo de cicatrização composto por quatro etapas sobrepostas: 1 na hemostasia, fatores de coagulação são liberados e ativam a cascata da coagulação; ocorre agregação plaquetária para prevenir a perda sanguínea. As plaquetas entram em contato com o colágeno e a trombina central desencadeia a formação de uma rede de fibrina, que fortalece o coágulo de plaquetas num coágulo estável. Quase simultaneamente a hemostasia, inicia-se a etapa 2 inflamatória, caracterizada pela secreção de citocinas das células imunes e remoção do tecido necrótico, controle da infecção por fagocitose e produção de radicais livres pelos macrófagos e neutrófilos. Nesta etapa, a pele apresenta-se edematosa, eritematosa, febril e dolorosa.

Posteriormente, na etapa 3 proliferativa ocorre formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), síntese de componentes da matriz extracelular (MEC) e reepitelização. Células endoteliais e fibroblastos migram para o local da ferida e se diferenciam em miofibroblastos para gerar componentes da MEC, que participam da reepitelização, como ácido hialurônico, colágeno, fibronectina e proteoglicano. Os fibroblastos são o tipo principal de células nesta etapa de cicatrização e tornam-se o tipo de célula predominante em três a cinco dias após a lesão. Na etapa 4 de remodelação, ocorre tanto a contração da ferida quanto a remodelação do colágeno (degradação do colágeno tipo III e formação do colágeno tipo I), e a resistência à tração do tecido aumenta; a síntese do novo epitélio completa o processo de cicatrização da ferida e todas as etapas que foram ativadas após as lesões são interrompidas [1–5].

Cada etapa da cicatrização possui processos moleculares e fisiológicos específicos que demandam diferentes propriedades dos curativos [5], importantes no tratamento de cicatrização de feridas [4]. Os curativos convencionais (como gaze, ataduras) podem simplesmente cobrir e proteger a ferida, e não conseguem manter um ambiente úmido no local da ferida, essencial para aceleração da cicatrização [6,7]. Estes por sua vez, não possuem efeito direto sobre a ferida com baixa biocompatibilidade e podem causar lesões secundárias quando substituídos ou removidos [4].

Atualmente, os denominados biocurativos desenvolvidos a partir da complexação de polissacarídeos naturais (quitina, quitosana, alginato, pectina, xantana, celulose e seus derivados: metilcelulose, carboximetilcelulose), têm-se mostrado promissores nos processos de cicatrização de lesões graves da pele [8–13], para as diferentes etapas do processo de cicatrização, por serem biocompatíveis e biodegradáveis, além de apresentarem características ideais para curativos: atóxicos [6,14] e não alergênicos com propriedades hemostáticas e antibacterianas, permitindo permeabilidade a gases em que oferecem um microambiente favorável, hidratado e com isolamento térmico; absorvem o excesso de exsudato; promovem proliferação celular e inibição de cicatriz [13,15,16].

Entre os biocurativos mais explorados estão as membranas poliméricas de quitosana (aminopolissacarídeo linear, composto por monômeros de D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina ligados por ligações glicosídicas formadas pela desacetilação da quitina), empregadas isoladamente ou complexadas com outros polissacarídeos ou outras substâncias [10,11,14,17], por apresentar características estruturais semelhantes aos glicosaminoglicanos (GAGs), componentes da MEC [18,19] (estrutura tridimensional composta por macromoléculas extracelulares, como colágeno, elastina, fibronectina, integrinas e lamininas, que fornecem suporte estrutural, bioquímico e ancoragem às células circundantes) [20]. A N-acetilglucosamina (NAG) presente na quitosana, é um componente dominante do tecido dérmico, essencial para a reparação dos tecidos cicatriciais, além de promover a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno [21].

Nos diversos biocurativos fisicamente distintos (membranas, soluções complexadas, hidrogéis, bandages, pomadas e outros), a quitosana pode acelerar sinergicamente a cicatrização quando comparados a outros tratamentos [11,22,23] por sua capacidade em induzir a expressão de genes que regulam a angiogênese, promovendo o crescimento precoce da granulação da ferida e a deposição de colágeno [4]. De forma geral, a quitosana contribui com a cicatrização da ferida por promover a hemostasia da ferida, aumento da adesão e agregação plaquetária; além de reduzir a resposta inflamatória, melhorando a proliferação endotelial vascular e aumentando a expressão de fatores de crescimento e produção de citocinas [7,23]. Além disso, estimulam a migração e proliferação de fibroblastos que secretam interleucina-8 (IL-8), um fator angiogênico e quimiotático de células endoteliais e epidérmicas, que produzem fibrose e epitelização [24].

A quitosana apresenta extensas aplicações biomédicas e farmacêuticas por exibir características de alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, não citotoxicidade, não cancerígena, não antigênica e apresentar atividades hemostática, antibacteriana, antifúngica, antioxidante [24–26] e propriedades anticancerígenas [18,27]; sendo explorada especialmente para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (nanopartículas à base de quitosana) [28] e uso em combinação com outras substâncias para melhorar seus efeitos terapêuticos [27]: estudo com animais experimentais, mostrou que uma membrana com quitosana e alginato foi capaz de modular a fase inflamatória, fibroplasia e colagenases, contribuindo para o processo de cicatrização [29]; biofilme de quitosana com nano-selênio resultou em uma cicatrização significativa de feridas cutâneas infectadas em ratos [30]; membranas compostas de quitosana e ácido hialurônico carregadas com edaravone, apresentou efeitos benéficos no tratamento de feridas cutâneas de ratos, devido a atividade antiinflamatória [21], quando impregnadas com ergotioneína, histidina e hercinina, as membranas de quitosana com ácido hialurônico contribuíram para uma cicatrização mais rápida de lacerações cutâneas em coelhos isquêmicos [31]; hidrogel de quitosana com fração de flavonoide isolado de um extrato de folha de *Passiflora edulis Sims*, mostrou-se eficaz na cicatrização quando aplicado na ferida de ratos diabéticos, por formar um filme com capacidade de estimular o sistema de defesa antioxidante [32].

A fim de acelerar o processo cicatricial, outros produtos orgânicos têm sido amplamente empregados, como o plasma rico em plaquetas autólogo (PRPa), devido a sua ação terapêutica estar ligada ao PDGF, (um iniciador universal do processo de cicatrização e o principal responsável pela aceleração da regeneração tecidual) [33,34]. Trata-se de uma fonte de fatores de crescimento que estimulam a resposta inflamatória, angiogênese, proliferação de fibroblastos e, conseqüentemente, aumento da síntese de colágeno [35–37].

Obtido por centrifugação do sangue total, o PRP contém uma concentração de plaquetas aproximadamente cinco vezes maior do que no sangue normal. Essa concentração pode variar de acordo com os tipos de PRP preparados por centrifugação em várias velocidades e tempos. As plaquetas são conhecidas principalmente por seu papel na hemostasia primária, promovendo o início e a regulação da cicatrização de feridas com uma gama diversificada de fatores de crescimento, citocinas e outras moléculas bioativas [38,39]. Os mediadores biológicos derivados de plaquetas têm dois efeitos primários na cicatrização de feridas: recrutar e ativar células que afetam a cicatrização de feridas e a regulação da angiogênese [40,41].

O PRP atraiu um interesse significativo, porque as plaquetas possuem vários fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além do fator de crescimento epidérmico, os quais são críticos para o reparo e regeneração tecidual, além de possuírem propriedades antibacterianas em lesões traumáticas [36,39–42]. Dentre os benefícios do PRP, como terapia anti-infecciosa, também foram relatadas sua capacidade de reduzir a infecção pela atividade antimicrobiana dos glóbulos brancos residuais. Ainda, as proteínas microbicidas presentes no PRP podem possuir propriedades quimiotáticas para células como neutrófilos, monócitos e células T, que desempenham papéis importantes na defesa contra invasão de patógeno [43].

O objetivo deste estudo foi enumerar, elencar e analisar as propriedades biológicas dos biocurativos a base de quitosana, bem como de seus derivados, e do PRPa reportados em estudos em todo o mundo, utilizando-se modelos experimentais de indução de feridas para promoção da cicatrização, por meio de revisão das variáveis analisadas e dos resultados obtidos em pesquisas recentes, disponíveis na literatura.

2. Metodologia

Este estudo foi desenvolvido como revisão bibliográfica de literatura científica com abordagem nas propriedades biológicas conferidas pela quitosana e PRPa no tratamento da cicatrização de feridas, empregando os descritores (conforme *Decs*): quitosana, cicatrização, PRP e biocurativos, separados pelos operadores booleanos AND e/ou OR. Foram consultadas as bases de dados: Pubmed, Medline, Lilacs e Science Direct. Dentre os critérios de inclusão, utilizaram-se: artigos publicados em português, inglês e espanhol indexados nas referidas bases de dados dos últimos 12 anos; para os estudos com uso da quitosana e do PRP foram considerados experimentos com animais e ensaios clínicos.

3. Discussão

3.1. Quitosana: Derivados e Propriedades Biológicas na Cicatrização de Feridas

A quitosana (polímero hidrofílico não tóxico obtido pela N-desacetilação da quitina na presença de 40-50% de NaOH a 180 °C) (Figura 1) [24] apresenta propriedades únicas, como não toxicidade, permeabilidade ao oxigênio, biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioatividade e mucoadesão [25,28], e suas bioatividades hemostática, antibacteriana, antifúngica e antioxidante [24–26] que favorecem seu uso em biocurativos para cicatrização de feridas, além de propriedades anticancerígenas [18,27]. Entretanto, é importante destacar que, apesar de suas propriedades físico-químicas e biológicas únicas, a quitosana não tem sido extensivamente utilizado na clínica devido à sua baixa solubilidade e fracas propriedades mecânicas. Assim, vários estudos tem sido realizados para modificações da estrutura química da quitosana (por N-acilação, N-alkilação, O-alkilação e oxidação de reação base de Schiff) (Figura 2), a fim de reduzir esses problemas, com a obtenção de derivados[28], que possam aprimorar os resultados em experimentos com tratamentos de feridas cirúrgicas a partir de biopolímeros.

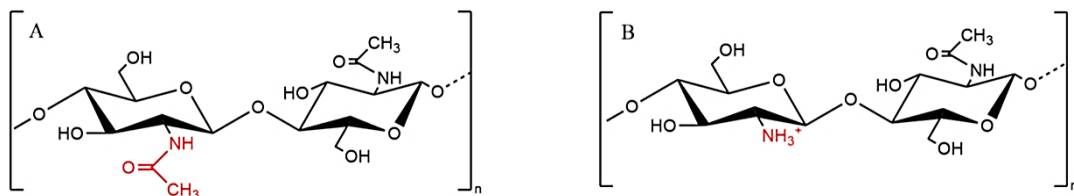


Figura 1. Estrutura química de fragmentos de quitina (A) e quitosana (B). [4].

Para superar a baixa solubilidade da quitosana em água, sua despolimerização e degradação mais rápida *“in vivo”*, sua hemo-incompatibilidade e suas propriedades antimicrobianas insuficientes, seus derivados foram sintetizados como novos materiais de suporte para engenharia de tecidos, com propriedades mais vantajosas no desenvolvimento de biocurativos, por apresentar melhor e mais controlada solubilidade em água, melhor estabilidade mecânica, maior eficácia hemostática e melhores propriedades antimicrobianas (Quadro 1) [4,26].

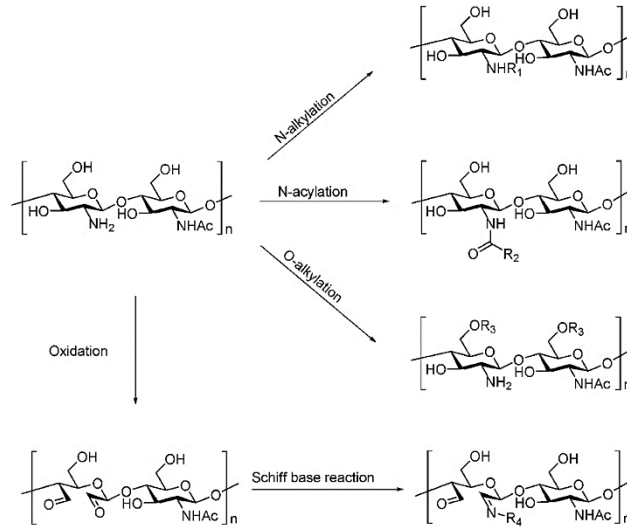
No mercado, existem várias formas disponíveis comercialmente de curativos à base de quitosana, como HemCon®, ChitoGauze® PRO, ChitoFlex®PRO, ChitoSam™, Syvek-Patch®, Chitopack C®, ChitopackS®, Chitodine®, ChitosanSkin®, TraumaStat®, TraumaDEX®, e Celox™ [26], com as mais diversas características (Quadro 2).

Quadro 1. Derivados da quitosana empregados em curativos para cicatrização de feridas.

Derivados de Quitosana	Características e Propriedades	Ref.
<i>N-Alquil</i> -quitosana	Apresenta melhor solubilidade em água; melhor estabilidade mecânica e eficácia hemostática.	[4,26]
Carboximetilquitosana	Possui maior solubilidade em água num pH > 7; e inibe a cicatrização	[4,26]
Quitosanas ramificadas de carboidratos	Além de apresentar solubilidade em água; podem ser aplicados no direcionamento de drogas devido a adição por alquilação redutora dos carboidratos na posição C-2 do esqueleto da quitosana, reconhecidos pelas lectinas.	[26]
Derivados tiolados de quitosana	Apresenta melhores propriedades antibacterianas, conferida pela tioureia.	[26]
Trimetil amônio quitosana	Apresenta solubilidade em água em uma ampla faixa de pH; além de boa flocculação e propriedades antiestáticas; e melhores propriedades antibacterianas.	[4,26]
Quitosanas fosfônicas <i>N-metileno</i>	Possui boa eficiência de complexação para cátions como Ca ²⁺ e metais de transição (Cu, Zn, etc.).	[26]
<i>N</i> -succinil quitosana	Derivado anfiprótico, possui excelentes propriedades físicas, químicas e biológicas necessárias para aplicações biomédicas.	[26]
Copolímeros enxertados com quitosana	Quitosana enxertada com polietilenoglicol, que tem a vantagem de ser hidrossolúvel.	[26]

As propriedades biológicas da quitosana que facilitam a cicatrização de feridas podem ser explicadas por alguns mecanismos: 1. Ação hemostática: a carga positiva da quitosana pode estimular a adesão de eritrócitos, adsorção de fibrinogênio e ativação plaquetária, tornando-a um potente agente hemostático [25,44]; 2. atividade antibacteriana: resultante da adesão eletrostática da quitosana a parede celular e membrana citoplasmática das células bacterianas, além da interação com alvos intracelulares para inibir a síntese proteica; [16,18,25,45]; 3. ação antiinflamatória: devido a capacidade da quitosana induzir níveis aumentados de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- β 1 e inibir a expressão de fatores pró-inflamatórios como o TNF- α [4,26]; 4. ação antioxidante: por estabilização e remoção dos radicais livres (espécies reativas de oxigênio - EROs) realizada pelos grupos amino e carboxila da quitosana, de vital importância para o estágio inflamatório da cicatrização, pois as EROs podem facilitar a cicatrização de feridas, estimulando a migração celular e a angiogênese, enquanto o excesso de EROs pode exacerbar a resposta inflamatória e impedir a cicatrização de feridas, especialmente em feridas crônicas [4]; 5 ação antifúngica: por promover cascatas apoptóticas fúngicas, incluindo acúmulo de EROs, disfunção mitocondrial e ativação da caspase [46].

A quitosana contribui com a cicatrização tecidual por promover a hemostasia da ferida, aumentando a adesão e agregação plaquetária, reduzindo a resposta inflamatória da ferida, melhorando a proliferação endotelial vascular e aumentando



a expressão de fatores de crescimento e citocina. Além disso, melhora a quimiotaxia e a função das células inflamatórias para acelerar a formação de tecido de granulação e, conseqüentemente, o processo de cicatrização de feridas [7,23]. Pode acelerar sinergicamente a cicatrização quando comparados a outros tratamentos [4,11,19,22], ativando a via TGF- β /Smad [27] e induzindo a expressão de genes que regulam a angiogênese, o que promove o crescimento precoce da granulação da ferida e a deposição de colágeno, além de criar um ambiente externo úmido e respirável, juntamente com a compressão física apropriada [4,24]. Ainda é importante destacar, que a quitosana é degradada por uma enzima chamada lisozima, cujos produtos de degradação são capazes de estimular macrófagos, influenciar positivamente a sedimentação do colágeno e, conseqüentemente, acelerar a cicatrização de feridas [24].

Figura 2. Os tipos básicos de reação da modificação da quitosana: [29].

Quadro 2. Preparações comerciais de quitosana e propriedades biológicas/indicações [26].

Comercial	Propriedades Biológicas/Indicações
Chitipack P® Eisai Co	Favorece a formação de tecido de granulação precoce.
Chitipack S® Eisai Co	Favorece a formação de tecido de granulação precoce, sem formação de cicatriz retroativa.
Tegasorb® 3M _	Indicado para feridas traumáticas e defeitos de tecidos cirúrgicos. Curativo à prova d'água cobre um hidrocolóide. Indicado para úlceras de perna, feridas sacrais, feridas crônicas.
Chitoflex® _	Antibacteriano e biocompatível. Combina-se fortemente com as superfícies dos tecidos e forma uma barreira flexível, que pode selar e estabilizar a ferida.
Chitoseal® Abbott _	Boa biocompatibilidade e função hemostática.
Chitopack C® Eisai	Repara completamente o tecido corporal, reconstrói o tecido subcutâneo normal e regenera a pele regularmente.
Bandagem HemCon®	Curativo hemostático de alto desempenho.
Reaxon® (Medovent, Alemanha)	Hidrogel biocompatível (evita irritação e inflamação), antiadesivo (inibe o tecido cicatricial e a formação de neuroma) e antibacteriano (previne a infecção).
ChitoSeat™	Selante hemostático eficiente nos casos de hemorragia cirúrgica de tecidos moles e duros.

3.2. Biocurativos diversos a base de quitosana (isolada ou complexada) na cicatrização de feridas experimentais

As preparações à base de quitosana demonstram um potencial significativo como biocurativos para cicatrização de feridas devido à sua alta porosidade, similaridade com a MEC da pele, bom contato superficial e excelentes propriedades antimicrobianas [25], além de promover um ambiente adequado de trocas gasosas e controle térmico, essencial para manutenção da hidratação necessária a cicatrização [13,15]. Como curativo biológico semipermeável, mantém o exsudato estéril da ferida sob uma crosta seca, evitando a desidratação e a contaminação da ferida [26].

Além das preparações comercializadas de quitosana, muitos pesquisadores produzem biocurativos diversos (membrana [25,47], pomadas [24], fibras e esponjas [44], membrana complexadas com demais compostos [30,31], hidrogel [48], hidrogel contendo flavonoide [32], entre outros) para aplicações experimentais na cicatrização de feridas, demonstrando a efetividade da quitosana em acelerar o processo cicatricial e reconstituição tecidual normal. Tratam-se de preparações de quitosana com várias massas molares e graus de desacetilação, atraindo muita atenção devido às suas propriedades biológicas potencialmente benéficas [49].

Pode-se observar diferentes tipos de biocurativos a base de quitosana (isolada ou complexada com outras substâncias), tipos de feridas, espécies amostrais estudadas e variáveis analisadas; que devem ser consideradas no delineamento e desenvolvimento de novos estudos sobre a cicatrização de feridas com o emprego de biomateriais (Quadro 3).

Segundo Andritoiu et al [24] uma pomada de quitosana, utilizada em seu experimento com feridas induzidas em ratos, demonstrou ter um papel importante na regeneração do tecido afetado, com produção normal de colágeno em seis dias após lesão do tipo incisão e excisão, com redução do tempo de cicatrização, além de atividade antimicrobiana confirmada por análise anatomopatológica, que constatou a presença de abscesso e infiltrado inflamatório nas lesões dos grupos controle negativo e tratado apenas com pomada base; exceto no grupo tratado com pomada de quitosana. Nas feridas do tipo excisão circular, o grupo tratado com pomada de quitosana apresentou no sexto dia de cicatrização uma taxa de contração da ferida (WCR) de $44,69 \pm 0,83\%$, enquanto o grupo controle apenas $5,78 \pm 1,86\%$ ($p < 0,001$).

Quando empregada num modelo de hemorragia da artéria femoral de rato, a fibra de quitosana (FC) e esponja de quitosana (EC) demonstraram eficácia hemostática superior aos curativos cirúrgicos regulares, com tempo de hemostasia após compressão de 4,69 min. para FC e 5,40 min. para EC; enquanto para os curativos com gaze o tempo de hemostasia foi de 7,33 min. O curativo de FC realizou hemostasia significativamente mais rápida ($p = 0,045$) do que a gaze, por fornecer uma área de superfície maior e simular de forma mais eficaz a estrutura de fibra da MEC [44]. Ao se ligar à ferida, o curativo de quitosana forma complexos de cátion-quitosana metálicos que aumentam a adesão de eritrócitos e plaquetas, criam um ambiente aniônico no local da lesão e induzem a aglomeração e efeito positivo na homeostasia [25,44].

Feridas isquêmicas em orelhas de coelhos foram realizadas com remoção completa do tecido da pele, e tratadas com membrana de quitosana (Ch) complexadas com ácido hialurônico (HA). Os animais foram divididos em três grupos, sendo grupo-controle (ferida coberta apenas com curativo), o segundo grupo (animais tratados apenas com a membrana Ch/HA); e o terceiro grupo (animais tratados com membrana de Ch/HA/ergotioneína, Ch/HA/hercinina ou Ch/HA/histidina). Os resultados para os grupos tratados foram promissores, onde

no 9º dia de evolução, houve aumento da porcentagem de cicatrização da ferida cutânea com a membrana Ch/HA em 73%, enquanto nos animais não tratados a cicatrização atingiu apenas 28%. A porcentagem de cicatrização aumentou até 92% após impregnação das membranas compostas Ch/HA com ergotioneína e hercinina. O tratamento de feridas cutâneas com as membranas compostas Ch/HA carregadas com histidina atingiu 81% [31].

Em seu estudo Wang et al. [25], avaliaram os efeitos de uma membrana de quitosana sobre coagulação sanguínea, ao comprimí-la em feridas cirúrgicas abdominais de pacientes por 3, 5 e 10 minutos. A capacidade do curativo absorver sangue foi analisada por meio da dosagem de hemoglobina, uma vez que, os curativos foram incubados em solução salina por 1, 3, 5 e 10 minutos. Cada paciente (n = 30) recebeu dois curativos ao mesmo tempo, e ambos os curativos foram aplicados na mesma ferida. Metade da ferida foi coberta com curativo de quitosana e a outra metade com gaze comum. A concentração de hemoglobina residual do curativo de quitosana na solução salina foi significativamente menor do que no curativo de gaze regular em todos os tempos de incubação (tempo 1 e 3 minutos com diferença significativa de $p < 0,05$ e tempo 5 e 10 minutos com $p < 0,01$), sugerindo que a quitosana atuou como um ativador pró-coagulante eficaz que ajuda o sangue a coagular mais rapidamente. Há evidências de que a quitosana altera a microestrutura da hemoglobina, aumentando a viscosidade do sangue ao interagir com trombócitos e eritrócitos carregados negativamente [50].

Estudo empregando membrana de quitosana (de alto peso molecular) no tratamento de feridas por incisão nas regiões metacarpianas e metatarsianas de equinos, não evidenciou diferença significativa quanto ao tempo de cicatrização e ao diâmetro das feridas dos membros torácicos e pélvicos; entre o grupo tratado com a membrana (80,5 dias para a cicatrização) e o grupo controle (76,1 dias) tratado apenas com solução de cloreto de sódio 0,9%. O período prolongado de cicatrização pode ser atribuído à formação de tecido de granulação exuberante em ambos os grupos, que apesar de benéfico para a cicatrização por induzir interleucinas responsáveis pela migração e proliferação de fibroblastos e queratinócitos, torna-se prejudicial à reparação tecidual quando excede a superfície da ferida [47].

Zangh et al. [48], demonstraram a eficácia de um hidrogel de carboximetilquitosana impregnado com genipina em diferentes concentrações (2,5%, 5%, 10% e 15%) para o tratamento de feridas cirúrgicas em ratos, que promoveu um maior percentual de contração das feridas dos ratos tratados com o hidrogel, quando comparado ao grupo controle (gaze). A ferida tratada com hidrogel contendo 5% de genipina alcançou o maior percentual de contração ou fechamento de $93,8 \pm 1,4\%$ no 14º dia, comparado ao percentual de $77,2 \pm 9,9\%$ do grupo tratado com gaze. A genipina pode mudar a cationicidade do hidrogel, que adsorve algumas moléculas biológicas envolvidas na proliferação celular e secreção da MEC levando a um aumento do crescimento e diferenciação de fibroblastos, síntese de MEC e remodelação.

Uma membrana de quitosana impregnada com nano-selênio foi empregada no tratamento de feridas experimentais infectadas por *Staphylococcus aureus* e evidenciou eficácia na cicatrização, bem como atividade antimicrobiana da quitosana. Houve diferenças significativas nas comparações do grupo tratado com membrana impregnada dos demais grupos, particularmente em termos de infiltração celular e neovascularização. A contagem de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MNC) e a proliferação de células fibroblásticas foram significativamente maiores do que as de outros grupos experimentais ($P < 0,05$) [30].

Estudar a ação da quitosana em feridas experimentais de animais diabéticos também tem sido atualmente explorada. Breder et al. [51], avaliaram a ação de uma membrana de quitosana com alginato no tratamento de feridas circulares (punch de

6,0 mm) induzidas em camundongos diabéticos. No estudo, os animais foram divididos em grupo controle, tratado com solução salina 0,9% e grupo membrana quitosana e alginato, e foram avaliados nos momentos 2, 4, 6, e 10 dias, quantos aos aspectos de contração da ferida e análise histológica. Ficou evidente no 6º dia de avaliação que o grupo tratado com a membrana apresentava menor área da ferida ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Mesmo nos camundongos hiperglicêmicos por ação da estreptozotocina (agente antineoplásico natural, tóxico para as células beta do pâncreas produtoras de insulina), ficou evidente a contribuição da membrana de quitosana e alginato em acelerar o processo de cicatrização. Análises morfológicas realizadas no 5º e 10º dias após a lesão indicaram menor número de leucócitos, vasos sanguíneos ($p < 0,05$) e fibroblastos no grupo tratado com membrana em relação ao grupo controle. No 10º dia, a análise qualitativa revelou que o grupo membrana e alginato apresentou um arranjo mais regular e uniforme das fibras colágenas tipo I e III em relação ao grupo controle, mas não houve diferença estatística na análise quantitativa. Estudos relatam que a membrana de quitosana e alginato modulam a fase inflamatória e estimulam a fibroplasia e as fibras colágenas, acelerando o processo de cicatrização de feridas em ratos saudáveis [29].

Quadro 3. Fatores que devem ser considerados no desenvolvimento de novos estudos experimentais de cicatrização de feridas.

Tipo de Curativo	Espécie Amostral	Tipos de Ferida	Variáveis Analisadas	Ref.
Pomada de Quitosana	Rato <i>Wistar</i>	Incisão linear Excisão circular Queimadura	Reepitelização e Histologia Taxa de Contração da Ferida (WRC) para ferida do tipo excisão circular	[24]
Fibra de Quitosana Esponja de Quitosana Membrana composta (Ch + HA)	Rato SD	Hemorragia de artéria femoral	Análise do tempo de hemostasia	[44]
Membrana composta (Ch/HA/ergotioneína, Ch/HA/hercinina ou Ch/HA/histidina)	Coelhos	Feridas Isquêmicas nas orelhas	Porcentagem de cicatrização da ferida cutânea Histologia	[31]
Membrana de Quitosana	Ensaio clínico em humanos	Incisão cirúrgica abdominal	Concentração de hemoglobina residual no curativo (efeitos sobre a coagulação)	[25]
Membrana de Quitosana	Equinos	Incisão	Mensuração do diâmetro Formação de tecido de granulação exuberante Tipo de exsudato Histologia.	[47]
Hidrogel de Carboximetilquitosana impregnado com genipina	Ratos <i>Sprague Dawley</i>	Incisão (10nm)	Porcentagem de contração da ferida Histologia	[48]
Membrana de Quitosana impregnada com Nano-selênio	Ratos <i>Wistar</i>	Excisão circular	Percentual de contração das feridas Histologia	[30]
Membrana de Quitosana e Alginato	Camundongos diabéticos	Excisão circular	Percentual de contração das feridas Análise morfológica Histologia	[51]
Hidrogel de Quitosana contendo	Ratos <i>Wistar</i>	Excisão circular	Percentual de contração das feridas Histologia	[32]

Ainda, com objetivo de explorar as bioatividades da quitosana em animais diabéticos, Soares et al. [32] desenvolveram um hidrogel de quitosana impregnado com um flavonoide extraído da folha de *Passiflora edulis Sims*, para o tratamento de feridas experimentais em ratos diabéticos por indução com aloxana. Observaram na avaliação macroscópica de contração da ferida, que o grupo tratado com hidrogel de quitosana, bem como o grupo tratado com hidrogel de quitosana impregnado com flavonoide, apresentavam maior percentual de contração da ferida. O hidrogel de quitosana, com ou sem flavonoide, acelerou o fechamento da ferida nos primeiros dois dias após a indução da lesão, em comparação com o grupo controle ($p < 0,01$). Esse mesmo perfil foi observado com 6 e 14 dias de tratamento ($p < 0,01$). Pode-se observar no 14º que o hidrogel contendo flavonoide promoveu maior produção de fibroblastos, síntese de colágeno e reepitelização.

Apesar dos estudos sobre a relação entre quitosana e cicatrização de feridas, Liu et al. [17] aponta que o pequeno número de ensaios disponíveis restringe a interpretação adequada dos resultados existentes; e que novas pesquisas devem ser rigorosamente delineadas para confirmar qualquer efeito clinicamente relevante da quitosana na cicatrização de feridas.

3.3. PRPa: Propriedades Biológicas na Cicatrização de Feridas

Diferentes mecanismos de cicatrização de feridas pelo uso tópico de PRP têm sido sugeridos, incluindo: 1. na degranulação, os grânulos alfa presentes nas plaquetas transformam as proteínas secretoras para o estado bioativo e as liberam para se ligarem a receptores transmembrana de células-alvo, ativando uma proteína sinalizadora que causa a expressão de uma sequência gênica e a produção de proteínas; 2. três proteínas (fibrina, fibronectina e vitronectina), presentes no PRP, podem atuar como um andaime que permite a migração vascular e celular; 3. pode inibir o crescimento bacteriano devido a sua faixa de pH estar entre 6,5 a 6,7; 4. as plaquetas podem armazenar proteínas antibacterianas e fungicidas, metaloproteases, fatores de coagulação e glicoproteínas de membrana, que podem influenciar a inflamação, induzindo a síntese de outras integritinas, interleucinas e citocinas [43].

As plaquetas desempenham um papel fundamental na hemostasia primária, aderindo rapidamente ao colágeno subendotelial, tornando-se ativadas, formando agregados e promovendo a coagulação nos locais de lesão (dentro de segundos a minutos) para selar um vaso sanguíneo e limitar a perda de sangue. Durante o reparo cicatricial, as plaquetas ativadas dentro da matriz de fibrina liberam o conteúdo de seus grânulos de armazenamento (fatores de crescimento importantes para a cicatrização de feridas, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Com papel fundamental no reparo e integridade endotelial, na vasculatura da pele durante a inflamação grave, as plaquetas promovem interações entre os receptores plaquetários glicoproteína (GP)VI e o receptor 2 de lectina tipo C (CLEC-2) com colágeno extravascular e podoplanina em macrófagos, respectivamente [52,53].

Um estudo de classificação proteômica e identificação de proteínas em PRPa, identificou um total de 125 proteínas relacionadas à cicatrização de feridas. Foram identificadas ainda, duas proteínas para migração de fibroblastos (THBS1 e DMTN), três proteínas para angiogênese (GPX1, H3BM21 e ITGB3), quatro proteínas para o processo de biossíntese de colágeno (F2, PRDX5, SERPINF2 e LTBP1), duas proteínas para o processo de biossíntese de glicosaminoglicanos (LUM e CLTC) e 13 proteínas

para ligação a glicosaminoglicanos (APOE, IGHM, APOB, CFH, HRG, PF4, SERPIND1, VTN, THBS1, ELANE, LPA, HABP2 e AZU1) (Quadro 4) [54].

Para avaliar as propriedades biológicas do PRPa na cicatrização de feridas Qu et al. [39] realizaram uma revisão sistemática, e avaliaram a eficácia e segurança da terapia com PRPa para feridas crônicas. Segundo os autores, em úlceras diabéticas de membros, a terapia PRPa aumentou a proporção de fechamento completo da ferida, encurtou o tempo para fechamento completo da ferida e reduziu a área e a profundidade da ferida, em comparação com o manejo sem o tratamento com PRPa. A comparação do tempo de cicatrização entre o PRPa e o grupo controle foi relatada em quatro estudos, dos quais três relataram redução significativa. Porém, estudos futuros devem enfatizar a caracterização dos produtos de PRPa, com descrição clara da concentração de plaquetas, conteúdo de fator de crescimento e contagem de leucócitos.

3.4. PRPa na Cicatrização de Feridas Experimentais

Em estudo longitudinal, Tetila et al [35], avaliaram a ação do PRPa (gel) isolado, gel de rosuvastatina e associação do PRPa a rosuvastatina na cicatrização de feridas experimentais induzidas em coelho com punch de 8mm. Foram realizadas quatro feridas no dorso do animal e tratadas com solução salina 0,9% (ferida A no lado superior esquerda), com gel de PRPa (ferida B no lado superior direito), com gel de rosuvastatina a 1,2% (ferida C no lado inferior esquerdo) e géis de PRPa e rosuvastatina (ferida D no lado inferior direito). Ao avaliar o percentual de contração, não foi verificada diferença estatística ($p > 0,05$) entre as feridas, que apresentaram, no 17º dia, 85,4% de contração com o gel de rosuvastatina, 87,4% com emprego dos géis de PRPa e rosuvastatina, 90,9% com gel de PRPa e 93,3% com solução salina 0,9%. Enquanto a avaliação histológica revelou reepitelização parcial em 100%, 50% e 75% das feridas tratadas com gel de PRPa, géis de PRPa e rosuvastatina e gel de rosuvastatina, respectivamente ($p > 0,05$). Ainda o estudo revelou que nas feridas tratadas com os géis de PRPa e rosuvastatina houve inibição da perda de sangue, como demonstrado pela ausência de características hemorrágicas. O uso de PRPa sozinho resultou em uma redução de 62,5% na perda de sangue, em comparação com a perda de 50% em feridas tratadas com a combinação dos géis, evidenciando a atividade hemostática primária do PRPa. Segundo os autores o processo mais lento de reparação se deu pela presença de mais células mononucleares e inflamação associada; além disso, é importante destacar que o PRP autólogos ou homólogos produzem uma cicatriz homogênea com menos células polimorfonucleares.

Quadro 4. Proteínas (gene e descrição) envolvidas no processo de cicatrização, identificadas em PRPa, segundo Lee et al. [54].

Gene	Descrição	Ação no processo de cicatrização
THBS1	Thrombospondin-1	Migração de Fibroblasto
DMTN	Dematin	
GPX1	Glutathione peroxidase 1	Angiogênese
H3BM21	Integrin beta (fragment)	
ITGB3	Integrin beta-3	
F2	Prothrombin	Biossíntese de Colágeno
PRDX5	Peroxiredoxin-5,mitochondrial	
SERPINF2	Alpha-2-antiplasmin	
LTBP1	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	
LUM	Lumican	Biossíntese de GAGs

CLTC	Clathrin heavy chain 1	
APOE	Apolipoprotein E	
IGHM	Ig mu chain C region	
APOB	Apolipoprotein B-100	
CFH	Complement factor H	
HRG	Histidine-rich glycoprotein	
PF4	Platelet factor 4	
SERPIND1	Heparin cofactor 2	Ligação a GAGs
VTN	Vitronectin	
THBS1	Thrombospondin-1	
ELANE	Neutrophil elastase	
LPA	Apolipoprotein(a)	
AZU1	Azurocidin	
HABP2	Hyaluronan-binding protein 2	

Pedroso et al. [37], avaliaram a ação do PRPa em autoenxerto de pele em equinos. Neste estudo foram produzidas duas feridas cutâneas de 6 x 6cm, em cada um dos lados da região glútea, e oito dias após a indução das feridas, foram realizados enxertos com fragmentos de pele colhidos do pescoço, assim como a aplicação do PRP. As feridas com autoenxertos do lado esquerdo receberam PRP (grupo T), e as com autoenxertos do lado direito não receberam tratamento (grupo C). Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos T e C em relação à quantidade de infiltrado inflamatório, fibroblastos jovens, colagenização e integração de autoenxertos. A neovascularização no 14º dia após o enxerto foi significativamente maior no grupo T ($p = 0,0191$), o que não foi observado nos demais momentos. Entretanto, não houve diferença em relação à reepitelização e quantificação de colágeno (por meio de coloração picrosírius) quando comparados os grupos C e T ($p > 0,05$). Segundo os autores, a ausência de desfecho positivo com uso do PRPa se deu pela baixa concentração plaquetária de 3,2 vezes referente a concentração do sangue total, devendo estar acima de 4 a 6 vezes.

Estudo examinou a migração induzida de células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSCs) na presença de PRP com gradientes de concentração de 0%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 80% e 100%. As ADSCs foram colocadas na câmara superior de uma placa Transwell (placa para cultura celular), com o PRP em diferentes concentrações na câmara inferior, com objetivo de verificar a migração das ADSCs para estudo experimental de cicatrização de feridas de ratas diabéticas com resultados promissores. Verificou-se que o PRP 20% induziu a maior migração das células-tronco, e pode "*in vivo*" promover maior neovascularização (angiogênese e vasculogênese), além da deposição de colágeno bem organizada na derme, promovendo consequentemente maior percentual de fechamento das feridas [55].

4. Considerações finais

A quitosana apresenta propriedades biológicas que favorecem a cicatrização de feridas experimentais, por sua ação hemostática, antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica e antioxidante, além de apresentar propriedades físico-químicas que conferem vantagens aos biocurativos, como sua permeabilidade ao oxigênio, que permite maior controle térmico da ferida, mantendo um ambiente hidratado, essencial para o processo cicatricial.

O PRP tem se mostrado eficiente na cicatrização de feridas em ensaios clínicos e experimentais, por ser fundamental no processo de hemostasia primária, com liberação dos fatores de crescimento críticos para o reparo e regeneração tecidual, além de apresentar propriedades antibacterianas. Além de apresentar diversas proteínas

relacionadas a cicatrização, quanto as propriedades de angiogênese, migração de fibroblastos, síntese de colágeno e GAGs.

Desenvolver estudos experimentais de cicatrização de feridas com uso de biopolímeros como a quitosana, exige atenção aos diversos fatores que podem influenciar na interpretação adequada dos resultados, como as preparações comerciais de biocurativos quitosana disponíveis e suas propriedades biológicas; os derivados da quitosana com melhor perfil de solubilidade em água, melhor eficácia hemostática e estabilidade mecânica para as preparações das formulações experimentais. Além dos diversos modelos experimentais de indução de feridas e variáveis analisadas. Ainda é importante destacar que a determinação da concentração de plaquetas no PRPa, pode ser fator previamente determinante para o sucesso no aprimoramento do seu uso.

Portanto, apesar das pesquisas apresentarem resultados promissores com uso do PRPa e da quitosana, seus usos na clínica ainda é limitado; assim, o aprimoramento do delineamento experimental de estudos que avaliam a cicatrização de feridas com uso de biomateriais é essencial.

Funding: Os autores declararam ter recebido o seguinte apoio financeiro para a pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo: Este trabalho é financiado por: UNOESTE, UniFAI e CAPES.

Acknowledgments: “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001”.

Conflicts of Interest: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Referências

1. Thiruvoth, F.M.; Mohapatra, D.P.; Kumar, D.; Chittoria, S.R.K.; Nandhagopal, V. Current concepts in the physiology of adult wound healing. *Plast. Aesthet. Res.* **2015**, *2*, 250-256. <http://dx.doi.org/10.4103/2347-9264.158851>
2. Liu, L.; Gao, Q.; Lu, X.; Zhou, H. In situ forming hydrogels based on chitosan for drug delivery and tissue regeneration. *Asian J Pharm Sci.* **2016**, *11*, 673-683. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.07.001>
3. Rajabian, M. H.; Ghorabi, G. H.; Geramizadeh, B.; Sameni, S.; Ayatollahi, M. Evaluation of bone marrow derived mesenchymal stem cells for full-thickness wound healing in comparison to tissue engineered chitosan scaffold in rabbit. *Tissue cell.*, **2017**, *49*, 112-121. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.11.002>
4. Shen, S.; Chen, X.; Shen, Z.; Chen, H. Marine Polysaccharides for Wound Dressings Application: An Overview. *Pharmaceutics*, **2021**, *13*, 1666. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101666>
5. Morales-González, M.; Díaz, L. E.; Dominguez-Paz, C.; Valero, M. F. Insights into the Design of Polyurethane Dressings Suitable for the Stages of Skin Wound-Healing: A Systematic Review. *Polymers*, **2022**, *14*, 2990. <https://doi.org/10.3390/polym14152990>
6. Alven, S.; Aderibigbe, B. A. Chitosan and Cellulose-Based Hydrogels for Wound Management. *Int J Mol Sci.*, **2020**, *21*, 9656. <https://doi.org/10.3390/ijms21249656>
7. Li, R.; Xu, Z.; Jiang, Q.; Zheng, Y.; Chen, Z.; Chen, X. Characterization and biological evaluation of a novel silver nanoparticle-loaded collagen-chitosan dressing. *Regen Biomater.*, **2021**, *7*, 371-380. <https://doi.org/10.1093/rb/rbaa008>
8. Meng, X.; Tian, F.; Yang, J.; He, C.N.; Xing, N.; Li, F. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *J Mater Sci Mater Med.*, **2010**, *21*, 1751-1759. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-3996-6>
9. Murakami, K.; Aoki, H.; Nakamura, S.; Nakamura, S.; Takikawa, M.; Hanzawa, M.; Kishimoto, S.; Hattori, H.; Tanaka, Y.; Kiyosawa, T.; Sato, Y.; Ishihara, M. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.031>
10. Bellini, M.Z.; Pires, A.L.R.; Vasconcelos, M.O.; Moraes, A.M. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. *J Appl Polym Sci.*, **2012**, *125*(S2), 421-431. <https://doi.org/10.1002/app.36693>
11. Bellini, M.Z.; Oliva-Neto, P.; Moraes, A.M. Properties of films obtained from biopolymers of different origins for skin lesions therapy. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **2015**, *58*, 289-299. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201500305>
12. Zong, A.; Cao, H.; Wang, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research. *Carbohydr Polym.*, **2012**, *90*, 1395-1410. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.026>

13. Wang, D.; Zhang, N.; Meng, G.; He, J.; Wu, F. The effect of form of carboxymethyl-chitosan dressings on biological properties in wound healing. *Colloids Surf B Biointerfaces.*, **2020**, *194*, 111191. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111191>
14. Bueno, C.Z.; Veiga, I.G.; Sacchetin, P.S.C.; Bellini, M.Z.; Moraes, A.M. Aplicação de polissacarídeos para a produção de curativos e outros biomateriais. In: *Biomateriais Aplicados Ao Desenvolvimento de Sistemas Terapêuticos Avançados*, 1 ed. Imprensa da Universidade de Coimbra, Portugal, **2015**, pp. 67-110. doi:10.14195/978-989-26-0881-5_2
15. Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Sudheesh Kumar, P.T.; Nair, S. V.; Tamura, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv.*, **2011**, *29*, 322-337. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005>
16. Sergi, R.; Bellucci, D.; Salvatori, R.; Cannillo, V. Chitosan-Based Bioactive Glass Gauze: Microstructural Properties, In Vitro Bioactivity, and Biological Tests. *Materials*, **2020**, *13*, 2819. <https://doi.org/10.3390/ma13122819>
17. Liu, Y.; Chen, J.; Li, P.; Ning, N. The Effect of Chitosan in Wound Healing: A Systematic Review. *Adv Skin Wound Care.*, **2021**, *34*, 262-266. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000723128.58588.b5>
18. Matica, M. A.; Aachmann, F. L.; Tøndervik, A.; Sletta, H.; Ostafe, V. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. *Int J Mol Sci.*, **2019**, *20*, 5889. <https://doi.org/10.3390/ijms20235889>
19. Colpas, P.T.; Alves, P.C.M.; Oliveira, C.C.; Pires, A.L.R.; Moraes, A.M.; Puzzi, M.B. Terapia celular combinada com membranas de biopolímeros melhora a cicatrização de úlceras em paciente com dermatomiosite juvenil. *Surg Cosmet Dermatol.*, **2018**. doi:10.5935/scd1984-8773.20181011129
20. Masson-Meyers, D. S.; Andrade, T. A. M.; Caetano, G. F.; Guimaraes, F. R.; Leite, M. N.; Leite, S. N.; Frade, M. A. C. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *Int J Exp Pathol.*, **2020**, *101*, 21-37. <https://doi.org/10.1111/iep.12346>
21. Tamer, T. M.; Valachová, K.; Hassan, M. A.; Omer, A. M.; El-Shafeey, M.; Mohy Eldin, M. S.; Šoltés, L. Chitosan/hyaluronan/edaravone membranes for anti-inflammatory wound dressing: In vitro and in vivo evaluation studies. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, **2018**, *90*, 227-235. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.053>
22. Tang, F.; Lv, L.; Lu, F.; Rong, B.; Li, Z.; Lu, B.; Yu, K.; Liu, J.; Dai, F.; Wu, D.; Lan, G. Preparation and characterization of N-chitosan as a wound healing accelerator. *Int J Biol Macromol.*, **2016**, *93*(Pt A), 1295-1303. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.101>
23. Taghipour, N.; Deravi, N.; Rahimi, M. Chitosan-based Scaffolds, Suitable Structures for Wound Healing Dressing: A Short Review. *J Regener, Reconstr Restor.*, **2020**, *5*, e11. <https://doi.org/10.22037/rrr.v5i1.31130>
24. Andritoiu, C. V.; Andriescu, C. E.; Danu, M.; Lungu, C.; Ivanescu, B.; Havarneanu, C.; Popa, M. Evaluation of the Wound Healing Potential of Some Natural Polymers on Three Experimental Models. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2021**, *14*, 465. <https://doi.org/10.3390/ph14050465>
25. Wang, C. H.; Cherng, J. H.; Liu, C. C.; Fang, T. J.; Hong, Z. J.; Chang, S. J.; Fan, G. Y.; Hsu, S. D. Procoagulant and Antimicrobial Effects of Chitosan in Wound Healing. *Int J Mol Sci.*, **2021**, *22*, 7067. <https://doi.org/10.3390/ijms22137067>
26. Valachová, K.; Šoltés, L. Versatile Use of Chitosan and Hyaluronan in Medicine. *Molecules.*, **2021**, *26*, 1195. <https://doi.org/10.3390/molecules26041195>
27. Satitsri, S.; Muanprasat, C. Chitin and Chitosan Derivatives as Biomaterial Resources for Biological and Biomedical Applications. *Molecules.*, **2020**, *25*, 5961. <https://doi.org/10.3390/molecules25245961>
28. Li, J.; Cai, C.; Li, J.; Li, J.; Sun, T.; Wang, L.; Wu, H.; Yu, G. Chitosan-Based Nanomaterials for Drug Delivery. *Molecules.*, **2018**, *23*, 2661. <https://doi.org/10.3390/molecules23102661>
29. Caetano, G. F.; Frade, M. A.; Andrade, T. A.; Leite, M. N.; Bueno, C. Z.; Moraes, A. M.; Ribeiro-Paes, J. T. Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, **2015**, *103*, 1013-1022. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33277>
30. Abbaszadeh, A.; Tehmasebi-Foolad, A.; Rajabzadeh, A.; Beigi-Brojeni, N.; Zarei, L. Effects of Chitosan/Nano Selenium Biofilm on Infected Wound Healing in Rats; An Experimental Study. *Bull Emerg Trauma.*, **2019**, *7*, 284-291. <https://doi.org/10.29252/beat-0703012>
31. Valachova, K.; Svik, K.; Biro, C.; Collins, M.N.; Jurcik, R.; Ondruska, L.; Soltes, L. Impact of Ergothioneine, Hercynine, and Histidine on Oxidative Degradation of Hyaluronan and Wound Healing. *Polymers*, **2021**, *13*, 95. <https://doi.org/10.3390/polym13010095>
32. Soares, R. D. F.; Campos, M. G. N.; Ribeiro, G. P.; Salles, B. C. C.; Cardoso, N. S.; Ribeiro, J. R.; Souza, R. M.; Leme, K. C.; Soares, C. B.; de Oliveira, C. M.; Elston, L. B.; da Fonseca, C. C. P.; Ferreira, E. B.; Rodrigues, M. R.; Duarte, S. M. S.; Paula, F. B. A. Development of a chitosan hydrogel containing flavonoids extracted from *Passiflora edulis* leaves and the evaluation of its antioxidant and wound healing properties for the treatment of skin lesions in diabetic mice. *J Biomed Mater Res A.*, **2020**, *108*, 654-662. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36845>
33. Vendramin, F.S.; Franco, D.; Franco, T.R. Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas. *Rev Bras Cir Plástica.*, **2010**, *25*, 589-594. <https://doi.org/10.1590/S1983-51752010000400004>
34. Medeiros, A. C.; Dantas-Filho, A. M. Cicatrização das feridas cirúrgicas. *J Surg Cl Res.*, **2017**, *7*, 87-102. <https://doi.org/10.20398/jscr.v7i2.11438>
35. Tetila, A.F.; Breda, M.R.S.; Nogueira, R.M.B.; Nai, G.A.; Laposy, C.B. The Use of Platelet-Rich Plasma and Rosuvastatin in Wound Healing in Rabbits: A Longitudinal Study. *Adv Ski Wound Care.*, **2019**; *32*, 1-5. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000577136.88748.68>
36. Marques, M.E.M.; Laposy, C.B.; dos Santos Silva, M.L.; Breda, M.R.; Matsumoto, M.M.; Justulin Junior, L.A.J.; Nai, G.A.; Osaki, G.A.T.; Camargo Filho, J.C.; Nogueira, R.M.B. Collagen quantification in rabbit dermal wounds treated with heterologous platelet-rich plasma gel. *Semina: Ciênc. Agrár.*, **2017**, *38*, 249-258. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n1p249>

37. Pedroso, A.C.B. da R; de Queiroz, A.K.L.; de Brito, E.S.A.; Costa e Souza, J.P.; Miguel, M.P.; Brandstetter, L.R.G; Dignani de Moura, V.M.B. Autologous platelet-rich plasma action on skin autografts in horses. *Cienc Rur.*, **2021**, 8, e20190811. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190811>.
38. Yildirim, U.; Kemal, O.; Aksoy, A.; Karaca, E.; Terzi, O.; Atmaca, S. Effects of submucosal PRP injection on wound healing in endonasal surgeries: an experimental study. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, **2020**, 277, 1681-1689. <https://doi.org/10.1007/s00405-020-05884-1>
39. Qu, W.; Wang, Z.; Hunt, C.; Morrow, A. S.; Urtecho, M.; Amin, M.; Shah, S.; Hasan, B.; Abd-Rabu, R.; Ashmore, Z.; Kubrova, E.; Prokop, L. J.; Murad, M. H. The Effectiveness and Safety of Platelet-Rich Plasma for Chronic Wounds: A Systematic Review and Meta-analysis. *Mayo Clin Proc.*, **2021**, 96, 2407-2417. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2021.01.030>
40. Smith, O. J.; Kanapathy, M.; Khajuria, A.; Prokopenko, M.; Hachach-Haram, N.; Mann, H.; Mosahebi, A. Systematic review of the efficacy of fat grafting and platelet-rich plasma for wound healing. *Int Wound J.*, **2018**, 15, 519-526. <https://doi.org/10.1111/iwj.12892>
41. Gentile, P.; Calabrese, C.; De Angelis, B.; Dionisi, L.; Pizzicannella, J.; Kothari, A.; De Fazio, D.; Garcovich, S. Impact of the Different Preparation Methods to Obtain Autologous Non-Activated Platelet-Rich Plasma (A-PRP) and Activated Platelet-Rich Plasma (AA-PRP) in Plastic Surgery: Wound Healing and Hair Regrowth Evaluation. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21, 431. <https://doi.org/10.3390/ijms21020431>
42. Ferracioli, E.; Laposy, C.B; Nogueira, M.R.; Justulin Júnior, L.A.; Camargo Filho, J.C.; Moreira, V.; Marques, M.E.; Nai, G.; Ozaki, G. Avaliação das fibras colágenas de feridas dérmicas de coelhos tratadas com diferentes fontes de plasma rico em plaquetas. *Arq. Bras. Med. Vet.*, **2018**, 70, 1179-1186. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9528>.
43. Yao, D.; Feng, G.; Zhao, F.; Hao, D. Effects of platelet-rich plasma on the healing of sternal wounds: A meta-analysis. *Wound Repair Regen.*, **2021**, 29, 153-167. <https://doi.org/10.1111/wrr.12874>
44. Wang, Y.-W.; Liu, C.-C.; Cherng, J.-H.; Lin, C.-S.; Chang, S.-J.; Hong, Z.-J.; Liu, C.-C.; Chiu, Y.-K.; Hsu, S.-D.; Chang, H. Biological Effects of Chitosan-Based Dressing on Hemostasis Mechanism. *Polymers.*, **2019**, 11, 1906. <https://doi.org/10.3390/polym11111906>
45. Dai, T.; Tanaka, M.; Huang, Y. Y.; Hamblin, M. R. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, **2011**, 9, 857-879. <https://doi.org/10.1586/eri.11.59>
46. Li, T.; Zhang, Y.; Xu, M.; Liu, Y.; Zhang, C.; Zhang, Y.; Peng, X.; Li, Z.; Qin, S.; Xing, K. Novel antifungal mechanism of oligochitosan by triggering apoptosis through a metacaspase-dependent mitochondrial pathway in *Ceratocystis fimbriata*. *Carbohydr. Polym.*, **2020**, 245, 116574. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116574>.
47. Martins, E.A.N.; Invernizzi, M.S.; Campos, M.G.N.; Teodoro, P.A.; Contieri, M.B.; da Silva L.C.L.C. Emprego de membrana de quitosana em feridas cutâneas induzidas experimentalmente em equinos. *Cienc Rural.*, **2013**, 43, 1824-1830. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013001000015>.
48. Zhang, N.; Gao, T.; Wang, Y.; Liu, J.; Zhang, J.; Yao, R.; Wu, F. Modulating cationicity of chitosan hydrogel to prevent hypertrophic scar formation during wound healing. *Int J Biol Macromol.*, **2020**, 154, 835-843. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.161>
49. Foster, L. J.; Ho, S.; Hook, J.; Basuki, M.; Marçal, H. Chitosan as a Biomaterial: Influence of Degree of Deacetylation on Its Physiochemical, Material and Biological Properties. *PLoS One.*, **2015**, 10, e0135153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135153>
50. de Lima, J. M.; Sarmiento, R. R.; de Souza, J. R.; Brayner, F. A.; Feitosa, A. P.; Padilha, R.; Alves, L. C.; Porto, I. J.; Batista, R. F.; de Oliveira, J. E.; de Medeiros, E. S.; Bonan, P. R.; Castellano, L. R. Evaluation of hemagglutination activity of chitosan nanoparticles using human erythrocytes. *Biomed Res Int.*, **2015**, 247965. <https://doi.org/10.1155/2015/247965>
51. Breder, J. S. C.; Pires, A. L. R.; Azevedo, F. F.; Apolinário, P. P.; Cantaruti, T.; Jiwani, S. I.; Moraes, Â. M.; Consonni, S. R.; Araújo, E. P.; Adams, G. G.; Saad, M. J. A.; Lima, M. H. M. Enhancement of cellular activity in hyperglycemic mice dermal wounds dressed with chitosan-alginate membranes. *Braz J Med Biol Res.*, **2019**, 53, e8621. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20198621>
52. Weller, C. D.; Gardiner, E. E.; Arthur, J. F.; Southey, M.; Andrews, R. K. Autologous platelet-rich plasma for healing chronic venous leg ulcers: Clinical efficacy and potential mechanisms. *Int Wound J.*, **2019**, 16, 788-792. <https://doi.org/10.1111/iwj.13098>
53. Chen, Z.; Wu, Y.; Turxun, N.; Shen, Y.; Zhang, X. Efficacy and safety of platelet-rich plasma in the treatment of severe burns: A protocol for systematic review and meta analysis. *Medicine*, **2020**, 99, e23001. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023001>
54. Lee, H. W.; Choi, K. H.; Kim, J. Y.; Kim, K. O.; Haotian, B.; Yuxuan, L.; Noh, K. C. Proteomic Classification and Identification of Proteins Related to Tissue Healing of Platelet-Rich Plasma. *Clin Orthop Surg.*, **2020**, 12, 120-129. <https://doi.org/10.4055/cios.2020.12.1.120>
55. Ni, X.; Shan, X.; Xu, L.; Yu, W.; Zhang, M.; Lei, C.; Xu, N.; Lin, J.; Wang, B. Adipose-derived stem cells combined with platelet-rich plasma enhance wound healing in a rat model of full-thickness skin defects. *Stem Cell Res Ther.*, **2021**, 12, 226. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02257-1>

Journal of Biomaterials
Applications XX(X):1–
10
©The Author(s) 0000
Reprints and
permission:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/ToBeAssigned
www.sagepub.com/

Morfologia e morfometria de feridas tratadas com biopolímero de quitosana/xantana/ β -glicana e plasma rico em plaquetas autólogo (PRPa)

SAGE

Valter Dias da Silva¹, Lidelci de Figueredo Bento¹, Liliane Girotto Pereira¹, Guilherme Batista do Nascimento², Cecília Laposy Santarém¹, Márcia Zilioli Bellini² e Rosa Maria Barilli Nogueira¹

Abstract

Promising results in the regeneration of skin lesions have been demonstrated with the use of products of natural origin (organic), such as dermal dressings made of polysaccharides (chitosan complexed with xanthan), as they promote a hydrated and thermally insulating microenvironment, allowing exchanges gaseous; and sources rich in growth factors such as autologous platelet-rich plasma (PRPa), which contains transforming growth factors beta (TGF- β), vascular endothelial (VEGF) and platelet-derived (PDGF), responsible for stimulating the cascade inflammation and healing. The objective of this work was to evaluate the action of a polymeric membrane (chitosan, xanthan and β -glycan) and PRPa in healing "in vivo", used alone or in combination. For the tests, rabbits underwent a surgical procedure to induce the lesion and were divided into a control group (GC), membrane group (GM), PRPa group (GPa) and membrane group associated with PRPa (GMPa), being evaluated at moments M0, M7, M14, M21 and M28 (28 days). The variables wound color and exudation, presence of infection and inflammation, formation of granulation, scarring and necrotic tissue, and morphological and morphometric analysis were analyzed. Statistical analyzes of the results were performed using the Software R® software, adopting a significance level of 5%. Differences between treatments in healing time were not statistically significant ($p>0.05$), and wounds showed 100% retraction at M21; significant differences were observed between the moments ($p<0,05$), showing that the complexed membrane alone or in combination with PRPa contributes to a humid environment and gas exchange necessary for healing, in addition to antimicrobial activity. Likewise, on the 7th day of healing, Gpa and GMPa contributed to a percentage of 29.71% and 21.65% in wound retraction, respectively, while the control group with 16.96%. From M7 to M14 statistically significant differences ($p<0,05$) were observed in the percentage of wound retraction in 55.66%, 54.88%, 38.38% and 40.22% for groups GC, GM, GPa and GMPa respectively. It is concluded that PRPa alone or associated with a membrane can effectively contribute to the healing of experimental surgical wounds, as they contribute to more significant percentages of retraction in the first 7 days of treatment when compared to other treatments, in addition to providing an adequate microenvironment for healing.

keywords:

chitosan, xanthan, β -glycan, healing, autologous platelet rich plasma (PRP)

Introdução

Os enxertos cutâneos (autólogos ou não), consistem na terapêutica empregada nos casos de lesões teciduais como feridas graves (queimaduras e úlceras), pois hospedam o tecido conjuntivo e estimulam o desenvolvimento de vasos

sanguíneos^{1,2}, contribuindo para um processo de cicatrização ordenado (inflamação: imunidade humoral e celular, amplo envolvimento da hemostasia, quimiotaxia de leucócitos e início da reparação tecidual, com a liberação de substâncias

vasoconstritoras, principalmente tromboxano A₂ e prostaglandinas, pelas membranas celulares; proliferação: fibroplasia, angiogênese e formação do tecido de granulação; e remodelação tecidual: envolvendo a síntese de novo colágeno mediado pelo fator de crescimento transformador beta (TGF- β); decomposição do colágeno antigo pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PGDF) com menor suscetibilidade às infecções^{3,4}.

No entanto, a técnica de enxertia pode garantir uma cobertura temporária da lesão, devido a rejeição e alta incidência de perda parcial do enxerto com recidiva do ferimento, o que limita seu uso; além de outros fatores, como: a extensão da área doadora, a condição clínica dos pacientes, a escassez de doadores e a necessidade da ferida apresentar leito com tecido de granulação saudável, ausência de tecido necrótico, de infecção e de corpos estranhos, para que o enxerto cicatrize de forma adequada⁵⁻⁷.

Como propostas terapêuticas alternativas, o emprego de curativos dérmicos bioativos à base de polissacarídeos naturais (quitina, quitosana, alginato, pectina, xantana, celulose e seus derivados: metilcelulose, carboximetilcelulose), isolados ou complexados (quitosana complexada com xantana), têm-se mostrado promissor nos processos de cicatrização de lesões graves da pele⁸⁻¹¹, pois além de atóxicos com elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade¹²⁻¹⁴, oferecem um microambiente favorável, hidratado e com isolamento térmico, removendo o excesso de exsudato e promovendo as trocas gasosas¹⁵⁻¹⁷. Além de apresentar atividade antimicrobiana e promover o crescimento de micróbios probióticos, melhorando assim a imunidade da pele e promovendo a cicatrização da ferida¹⁸.

Entre os polissacarídeos apontados na formulação destes curativos dérmicos, destacam-se: a quitosana (polissacarídeo composto por monômeros de D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina)^{2,8,19}, por sua atividade antimicrobiana e capacidade de acelerar a cicatrização, além da elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades de absorção e adsorção^{3,11,18,20,21,22}; e a xantana (obtida por fermentação a partir da bactéria *Xanthomonas campestris*), um polissacarídeo atóxico, que por sua atividade emulsificante, estabilizante e floculante, com capacidade de formar géis, filmes e membranas²³, possibilita a obtenção de matrizes que apresentam elevada absorção de soluções aquosas e com estabilidade comprovada em fluidos biológicos¹⁰. Os curativos à base de quitosana estimulam o fechamento, neovascularização e regeneração permanente da derme; reduzem o risco de amputações e de infecções por microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa*²⁴. Hidrogéis à base de quitosana possuem eficácia antibacteriana contra cepas de *E. coli* Gram-negativas, o que é atribuído à interação da quitosana com a membrana plasmática das bactérias¹⁴.

A β -glicana, um polissacarídeo constituinte estrutural da parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais têm demonstrado diversos efeitos benéficos, entre eles: atividade imunomodulatória, anti-inflamatória, antitumoral, antimutagênica e antioxidante^{25,26}, sendo este composto considerado hipocolesterolêmico e hipoglicêmico, além de exercer efeito protetor contra infecções²⁷⁻³⁰.

¹Departamento de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 19067-175, SP, Brasil

²Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Centro Universitário de Adamantina, Adamantina, 17800-000, SP, Brasil

Corresponding author:

Valter Dias da Silva, Departamento de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 19067-175, SP, Brasil Email: vrdiass@fai.com.br

A contribuição destes curativos dérmicos na qualidade do processo cicatricial não envolve apenas o menor tempo de cicatrização, e sim, a prevenção de possíveis infecções^{21,22,31} e potencial efeito no depósito de colágeno na fase de remodelação tecidual (envolvendo a síntese de novo colágeno mediado pelo TGF- β e a decomposição do colágeno antigo pelo PDGF), que uma vez desorganizada pode resultar em distúrbios de cicatrização ou cicatrização excessiva (queloide e cicatriz hipertrófica), devido a função exagerada de fibroblastos e acúmulo de matriz extracelular (MEC), decorrentes de resposta inflamatória excessiva durante a cicatrização, com perda do controle normal entre síntese e degradação^{3,32}.

Ainda, é importante destacar, que é essencial na reparação tecidual uma fonte rica em fatores de crescimento. Recentemente, o plasma rico em plaquetas autólogo (PRPa) (concentrado de plaquetas obtido a partir do sangue autógeno do paciente), tem apresentado resultados significativos em diversos ramos da medicina, inclusive em estudos para o tratamento da cicatrização de feridas. Em coelhos, a aplicação do PRPa mostrou, por meio de ressonância magnética, a formação de nova cartilagem. Isso indica sua capacidade em reconstruir e regenerar a cartilagem³³.

Produto orgânico, atóxico e não imunorreativo, que estimula e acelera a cicatrização de feridas, o PRPa pode ajudar na integração de enxertos cutâneos em feridas crônicas, devido a sua ação terapêutica estar ligada ao PDGF^{6,34,35}. O plasma contém fibrinogênio, que age como uma rede, capturando as plaquetas da ferida para formar o coágulo, o que limita o sangramento e começa a sinalização de citocinas. Os grânulos α das plaquetas liberam os fatores de crescimento (TGF- β , VEGF e PDGF), os quais são responsáveis pela estimulação da cascata inflamatória e de cicatrização^{3,36}. Dessa forma, as plaquetas iniciam e regulam os aspectos básicos da cicatrização de lesões e representam o componente mais importante quando o objetivo é a modulação cicatricial³⁷.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de análise clínico-morfológica e morfométrica (percentual de retração da ferida), a recuperação da pele através da realização de testes *in vivo*, com uso da membrana polimérica, isolada e associada a aplicação de PRPa.

Materiais e métodos

Preparação das Membranas

As membranas densas e porosas de quitosana complexadas com xantana e β -glicana foram preparadas de acordo com os procedimentos descritos por Bellini et al.¹⁰ e Nakasse et al.

²⁶, na razão de massa de quitosana para xantana para β -glicana igual a 1:0,85:0,15; 90 ml da solução de quitosana a 1% (m/v) em ácido acético 2% (v/v) que foi gotejada a uma solução contendo 0,765g de xantana e 0,135g de β -glicana.

Para a obtenção das membranas a solução de quitosana foi adicionada através de bomba peristáltica a uma vazão de 10 mL/min à solução de xantana com β -glicana previamente

Dias da Silva et al.

seca. Ao término da secagem, para a neutralização do pH das membranas, foram submetidas a sucessivas lavagens com água destilada e deionizada e com tampão HEPES a 10 mM por 30 minutos (com três repetições) e novamente secas em estufa de circulação de ar a 37°C.

Testes de cicatrização in vivo e preparo do PRPa

Os procedimentos experimentais desenvolvidos foram aprovados (protocolo n° 6115) pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista. Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) do biotério central (n = 24), pesando de 3,0 a 4,0 kg, foram mantidos em gaiolas individuais, com água potável e ração comercial ad libitum. Para cálculo do tamanho amostral, foi utilizada a seguinte equação: $n = \frac{z^2 \cdot s^2 \cdot N}{e^2 \cdot (N-1) + (z^2 \cdot s^2)}$, sendo n = tamanho da amostra; N = tamanho da população; z = variável normal padronizada associada ao nível de confiança; s = desvio-padrão; e = erro amostral ³⁸. O cálculo foi realizado utilizando um nível de confiança de 95% e uma taxa de erro de 3,5%, e considerou-se que a quantidade total de coelhos no biotério era igual a 50 (N). Em relação ao desvio-padrão, usou-se s = 0,0469, considerando-se o desvio-padrão obtido em trabalho semelhante ³⁹. Assim o tamanho amostral obtido foi de 6 animais, ou seja, cada um dos 4 grupos considerados na pesquisa contendo 6 animais.

Para obtenção do PRPa, os animais foram anestesiados, por via intramuscular (IM), com Cloridrato de Xilazina 2% (Xilazin® 2%) e Cloridrato de Zolazepan (Zoletil® 50) em associação, na dose de 15mg/kg ⁴⁰. Foram coletados 10 mL de sangue da veia marginal auricular dos coelhos, por meio da canulação com cateter 20 g ⁴¹. A amostra coletada foi dividida em dois frascos estéreis contendo citrato de sódio 3,2% (Greiner Bio-one Brasil – tubo estéril com citrato de sódio 3,2%), homogeneizada por inversão constante, resultando em 5 mL de sangue total em cada frasco, protegido da luminosidade e à temperatura aproximada de 22°C. De cada frasco foi retirada uma alíquota para contagem do número de plaquetas (contador automático Sysmex Poch Diff 100iV – Roche®). Foram aguardados 30 minutos para se iniciar a centrifugação, de modo a minimizar a agregação plaquetária.

Na primeira etapa de centrifugação, o sangue foi centrifugado a 200 gravidades (G) (centrífuga Excelsa II, modelo 206-BL Fanem®) por 10 minutos, permitindo a formação de três camadas: camada superior ou sobrenadante (PPP) amarelado; camada leucoplaquetária esbranquiçada; e camada inferior (hemácias) vermelha. O plasma sobrenadante e a camada leucoplaquetária de cada um dos dois tubos foram pipetados e transferidos para tubos secos e

misturadas sob constante agitação de 112 G por 2 minutos antes da adição da quitosana.

Após a complexação polimérica, a suspensão foi transferida para uma placa de poliestireno de 15 cm de diâmetro e seca em estufa com circulação de ar a 37°C, por aproximadamente 24 horas até a formação de uma membrana

estéreis para a realização da segunda etapa da centrifugação, a 400 G por 10 minutos. Do sobrenadante, 2/3 foram descartados como PPP, e o 1/3 restante homogeneizado com intuito de ocorrer dispersão das plaquetas e formação do PRPa. Neste momento, realizou-se a contagem do número de plaquetas, tendo como referência mínima a quantidade de 1.000.000/mm³ para ser considerado plasma enriquecido ^{42,43}.

Após a coleta sanguínea para preparo do PRPa, com os animais ainda anestesiados, foi realizada a tricotomia da região dorsal de cada animal, por meio de um tricotomizador elétrico (AGC®), com lâmina número 40. Realizada antissepsia da pele com álcool 70%, a área da ferida foi previamente demarcada (com caneta hidrográfica) e quatro feridas circulares de 0,8 cm de diâmetro foram feitas na região dorsal com auxílio de *punch* dermatológico de 8 mm; identificadas como ferida 1 (F1), 2 (F2), 3 (F3) e 4 (F4) (Figura 1) ^{33,44}. Para o controle da dor pós-cirúrgica, foi administrada via intramuscular (IM), cloridrato de tramadol (0,5 mg/kg) (Tramal®) ⁴⁵.

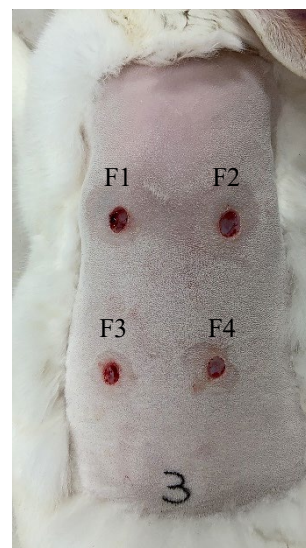


Figura 1. Feridas experimentais induzidas na região dorsal do animal.

Os animais foram identificados numericamente (Figura 1), mantidos em gaiolas individuais (com água potável e ração comercial ad libitum), e separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais, designados grupo controle (GC), grupo membrana (GM), grupo PRPa (GPa) e grupo membrana com PRPa (GMPa). Esses animais foram submetidos aos tratamentos conforme descrito na Quadro 1 e acompanhados diariamente. Todo o processo de cicatrização

foi avaliado nos momentos M0, M7, M14, M21 e M28 (28 dias), após o procedimento experimental.

No GC, as feridas foram cobertas com curativo do tipo band-aid. No GM, com membranas densas e porosas (quitosana/xantana/ β -glicana) de 0,8 cm de diâmetro, previamente hidratada em solução salina 0,9%. No GPa, com PRPa em gel (tópico) e curativo do tipo band-aid. No GMPa as feridas foram cobertas com o PRPa em gel (tópico) e membrana previamente hidratada.

Avaliação morfológica e morfométrica da cicatrização

Foram realizadas avaliações morfológicas, morfométricas e fotográficas, imediatamente após a lesão experimental (M0) e nos momentos M7, M14, M21 e M28 (28 dias) após o início do experimento⁴⁶.

Na análise clínico-morfológica foram observadas características como: exsudação da ferida, presença de infecção e inflamação, tecido de granulação e cicatricial, tecido necrótico⁴⁷ (score: 1-presente, 0-ausente), e cor da ferida (score: 1-rósea, 2-amarelada, 3-pálida, 4-cianótica)⁴⁸.

Quadro 1. Distribuição dos animais por grupo utilizados no experimento.

Grupo	Animais	n(lesões)	Tratamento	Momentos
GC	6	24	Solução de NaCl (0,9%)	M0, M7, M14, M21, M28
GM	6	24	Membrana	M0, M7, M14, M21, M28
GPa	6	24	PRPa	M0, M7, M14, M21, M28
GMPa	6	24	Membrana + PRPa	M0, M7, M14, M21, M28

Para análise clínico-morfométrica a mensuração das bordas das feridas (largura e altura) em milímetros foi feita com auxílio de paquímetro digital (DC-60 Western®). As medidas obtidas foram usadas para calcular o percentual da área remanescente de ferida em relação à área inicial (PAFR), utilizando-se a seguinte fórmula: $PAFR = (AM/AI) \times 100\%$, em que PAFR é o percentual da área de ferida em relação à área inicial, AI = área original da ferida no dia zero e AM = área mensurada em cada momento de avaliação⁴³.

Após o término do experimento os animais foram eutanasiados com overdose de Cloridrato de Xilazina 2% (Xilazin® 2%) e Cloridrato de Zolazepan (Zoletil® 50) em associação.

Análise estatística

A análise das variáveis quantitativas foi realizada considerando os valores de média e desvio-padrão e das variáveis qualitativas o valor da frequência absoluta. O efeito dos tratamentos e dos momentos na variável quantitativa PAFR foi obtido por meio do Modelo Linear Generalizado Misto, considerando a distribuição de Poisson e animal como um efeito aleatório. Uma vez que os resíduos padronizados do modelo não atenderam as pressuposições de normalidade e homoscedasticidade verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. O efeito do tratamento e do momento nas variáveis dicotômicas (presença/ausência) foi verificado por meio do Modelo Linear Generalizado Misto, considerando a distribuição Binomial e animal como um efeito aleatório. Em todos os modelos, os contrastes dentro dos fatores foram obtidos por meio do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Todas as análises foram realizadas

no Software R® (R Core Team, 2020), sendo adotado um nível de significância igual a 5%.

Resultados e discussão

A avaliação morfométrica, na qual a área coberta epitelial foi considerada macroscopicamente, não evidenciou diferença significativa entre os grupos, quando avaliados exsudação da ferida, presença de infecção e inflamação, tecido necrótico, tecido de granulação e cicatricial; assim como não foi possível obter diferença significativa para as variáveis borda da ferida e crosta, devido ao modelo linear generalizado misto aplicado aos dados, apresentar singularidade na matriz de covariância (Tabela 1). Nenhum dos grupos apresentou anormalidades de cicatrização; e não foi observado sinais clínicos compatíveis com infecção bacteriana (aumento do exsudato seroso, secreção purulenta, necrose, odor e outros) em nenhuma ferida para os quatro grupos, sugerindo ausência de processo infeccioso. Estudos apontam a capacidade dos biocurativos no controle da infecção, devido a adesão eletrostática da quitosana a parede celular e membrana citoplasmática das células bacterianas, além da interação com alvos intracelulares para inibir a síntese proteica^{14,18,24,31}. É importante destacar que os curativos ideais devem ser atóxicos e não alergênicos com propriedades hemostáticas e antibacterianas, permitindo permeabilidade a gases, capacidade hidratante, absorção de exsudato, promoção da proliferação celular e inibição de cicatriz^{18,31}. Atualmente, as limitações associadas ao uso de alguns dos curativos comuns empregados incluem dificuldade na remoção do curativo, incapacidade de proteger a ferida contra infecção microbiana, má troca gasosa entre a ferida e o entorno, propriedades mecânicas deficientes, falta de esterilidade, indução de reações

alérgicas, má absorção de exsudatos de feridas e sua incapacidade de sustentar um ambiente úmido para cicatrização acelerada^{14,49}.

No M7 observou uma redução gradativa (percentual de retração) no diâmetro das feridas do GC (16,96%), GM (16,63%), GPa (29,71%) e GMPa (21,65%), com cicatrização completa (100%) aos 21 dias (Tabela 2 e Figura 2). A análise estatística não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) no percentual de retração das feridas entre os diferentes tipos de tratamentos (controle, membrana, PRPa e membrana+PRPa) em M7 e M14 (Tabela 2 e Figura 3). No entanto, outros estudos apontam que o emprego da quitosana em biocurativos fisicamente distintos (membranas, soluções complexadas, hidrogéis, bandages e outros) isolada ou em associação pode acelerar sinergicamente a cicatrização quando comparados a outros tratamentos^{11,45,49,50,51}, por induzir a expressão de genes que regulam a angiogênese, promovendo o crescimento precoce da granulação da ferida e a deposição de colágeno; além de criar um ambiente externo úmido e respirável, juntamente com a compressão física apropriada⁴⁹. A cicatrização de feridas profundas por queimaduras de segundo grau, também pode ser acelerada quando a quitosana é complexada com celulose e nanopartículas de prata, por desempenhar um papel importante na regulação do crescimento e fatores inflamatórios, incluindo VEGF, EGFL-7, TGF- β 1, bFGF, TNF- α e IL-1 β ⁵². Ainda estudos com uso de PRPa em gel no tratamento da cicatrização de feridas, evidenciaram sua eficácia em acelerar o processo de cicatrização^{39,52,53,54},

contribuindo ainda com aumento da angiogênese de feridas cirúrgicas em coelhos^{44,55} e produção de fibras colágenas mais organizadas, quando comparado PRP heterólogo⁴³.

O curativo biológico a partir da complexação de quitosana e xantana permite a absorção de água, soluções e fluidos biológicos, além de permeabilidade ao gás, e outras propriedades, mostrando potencial para diferentes fases de cicatrização de feridas^{14,17,18,56}. As características estruturais da quitosana são semelhantes aos glicosaminoglicanos (GAGs), que são componentes da MEC; portanto, essa característica recomenda o uso da quitosana na engenharia de tecidos cutâneos^{19,31,57}. Estudos apontam que a quitosana melhora a quimiotaxia e a função de células inflamatórias acelerando a formação de tecido de granulação e reepitelização, acompanhadas de angiogênese e deposição regular de fibras de colágeno, limitando a formação de cicatrizes e retração tecidual^{11,50}. Enquanto a xantana devido a sua capacidade de formar géis, filmes e membranas²³, possibilita a obtenção de matrizes que apresentam elevada absorção de soluções aquosas e com estabilidade comprovada em fluidos biológicos¹⁰.

O interesse na adição da β -glicana na membrana polimérica de quitosana/xantana^{10,26} se deu por suas propriedades antioxidantes⁵⁸, indução de resposta imune (inata e adaptativa)⁵⁹ e regulação da apoptose de células em proliferação e invasão⁶⁰. Porém, é importante destacar que as características físico-químicas da membrana de quitosana associada a xantana¹⁰ é alterada com a adição de concentrações distintas de β -glicana⁶¹.

Tabela 1. Frequência absoluta das variáveis qualitativas nos diferentes tratamentos e momentos M0, M7, M14, M21 e M28 dias.

Tratamento	Momento	Bordas da ferida		Crosta	
		Presença	Ausência	Presença	Ausência
Controle	0	-	-	-	-
	7	0	6	6	0
	14	0	6	0	6
	21	0	6	0	6
	28	0	6	0	6
Membrana	0	-	-	-	-
	7	0	6	6	0
	14	0	6	2	4
	21	0	6	0	6
	28	0	6	0	6
PRPa	0	-	-	-	-
	7	5	1	6	0
	14	0	6	3	3
	21	0	6	0	6
	28	0	6	0	6
PRPa+Membrana	0	-	-	-	-
	7	0	6	6	0
	14	5	1	5	1
	21	0	6	0	6
	28	0	6	0	6

Membranas de proporção polimérica X:Q:G igual a 1:0,85:0,15, mostraram-se menos densas, e com espessura média menor ($0,046 \pm 0,008$ mm), quando comparadas a proporção polimérica X:Q:G igual a 1:1:0, com espessura

de $0,104 \pm 0,027$ mm. A adição da β -glicana influencia diretamente na redução da espessura do biocurativo, que deve ser menos espesso que a pele (entre 0,5 e 2 mm), para garantir as propriedades de absorção de soluções aquosas, capacidade de impregnação e liberação de fármacos, bem

como a capacidade de trocas gasosas. Entretanto, quando se trata da propriedade físico-química de permeação, a β -glicana reduz a capacidade de permeação de água, solução salina e fluido corpóreo simulado, quando adicionada a membrana de quitosana/xantana¹⁰, o que pode diminuir a capacidade do biocurativo em impedir o acúmulo de exsudato no local da ferida⁶¹.

A capacidade de absorver o exsudato da ferida e a permeabilidade são importantes na fase inicial da cicatrização da ferida. A permeabilidade ao gás determina a capacidade de controle da perda de fluido, uma característica física fundamental dos materiais para curativos de feridas, além de controlar diretamente o ambiente úmido durante a cicatrização de feridas, o que beneficia o processo de reparo tecidual. Curativos com permeabilidade a gases na faixa de 2.000-2.500g/24h·m² por dia são ideais para manter o

ambiente cicatricial úmido, pois a baixa permeabilidade ao gás pode aumentar o risco para infecção bacteriana, por deixar o exsudato na borda da ferida¹⁷.

Do M7 para o M14 (subtraindo os valores) diferenças significativas ($p < 0,005$) foram observados no percentual de retração das feridas, para todos os grupos: com redução de 55,66%, 54,88%, 38,38%, 40,22%, para os grupos GC, GM, GPa e GMPa respectivamente. Nota-se uma retração menor para os grupos GPa (38,38%) e GMPa (40,22%) no intervalo M7 a M14, quando comparados aos GC (55,66%) e GM (40,22%), pois apesar da não significância estatística no M7 entre os tratamentos, é possível observar um maior percentual de retração das feridas de 29,71% para o grupo GPa e 21,65% para o GMPa (Tabela 2), corroborando com os achados de Tetila et al.³⁹.

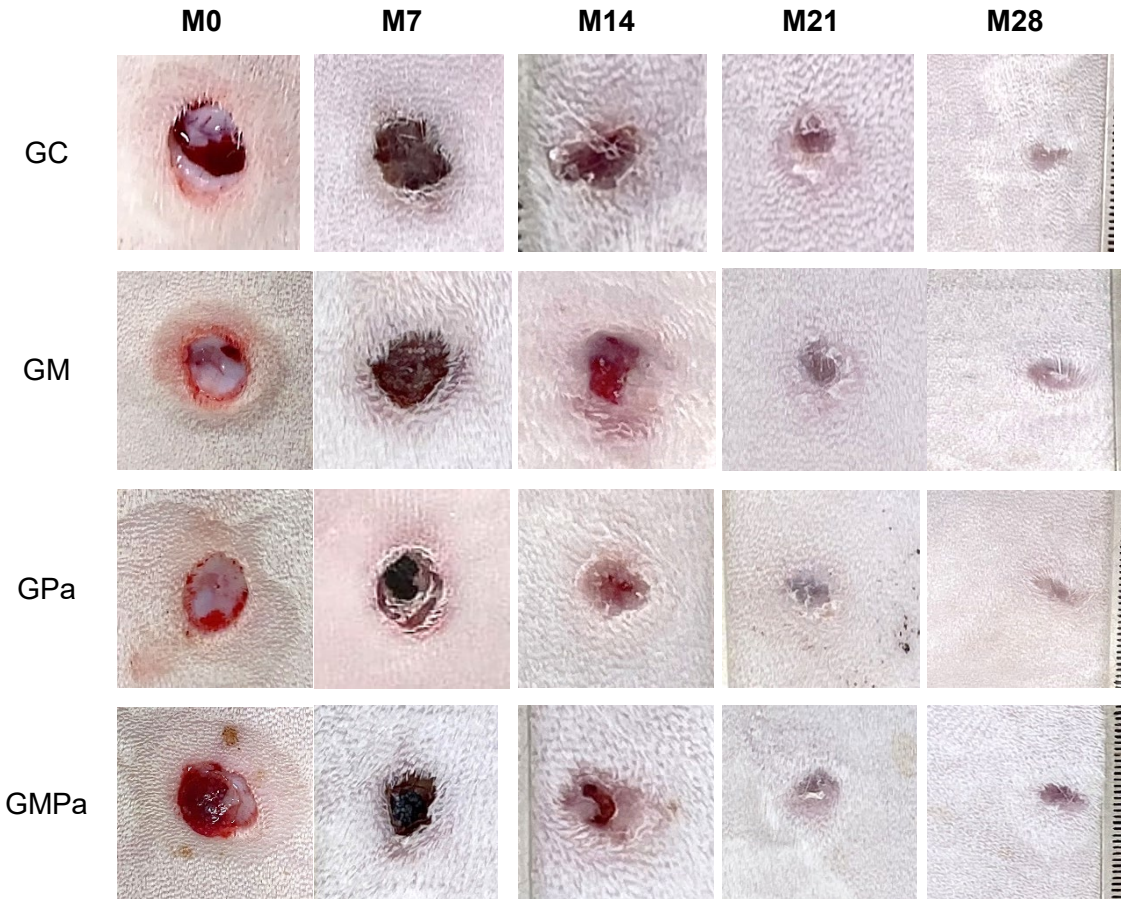


Figura 2. Macroscopia do processo de cicatrização de feridas nos momentos M0, M7, M14, M21 e M28 dias, para os distintos tratamentos.

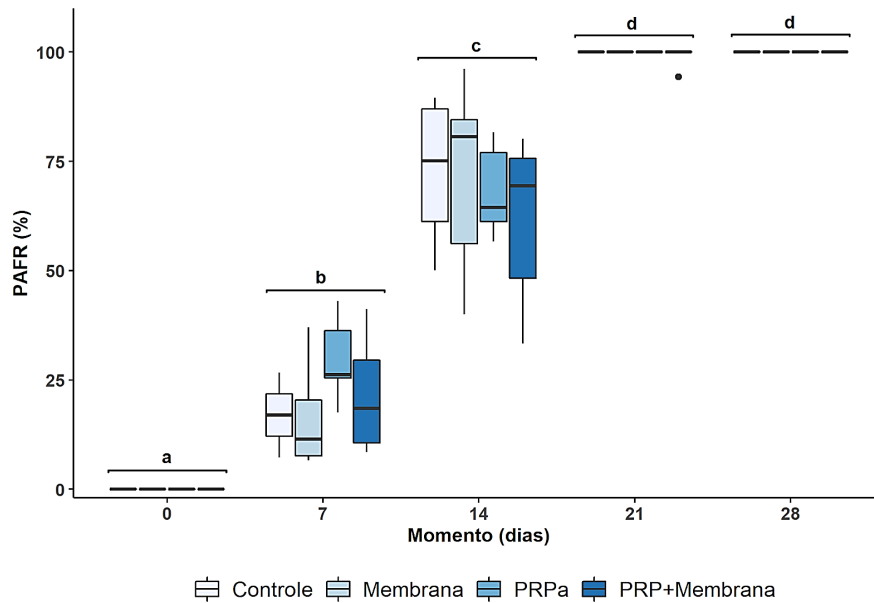


Figura 3. Análise gráfica da variável percentual da área remanescente de ferida em relação à área inicial (PAFR) nos diferentes tratamentos e momentos. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os momentos dentro de cada tratamento.

Dias da Silva et al.

Tabela 2. Análise descritiva do percentual da retração da ferida em relação à área inicial (PAFR), nos diferentes tratamentos e momentos.

Tratamento	Momento	n	Média	DP	Min	Max
Controle	0	6	0,00 ^a	0,00	0,00	0,00
	7	2	16,96 ^b	13,69	7,28	26,64
	14	5	72,62 ^c	16,89	50,11	89,62
	21	6	100 ^d	0,00	100	100
	28	5	100 ^d	0,00	100	100
Membrana	0	6	0,00 ^a	0,00	0,00	0,00
	7	4	16,63 ^b	14,06	6,62	37,02
	14	5	71,51 ^c	22,84	40,02	96,16
	21	6	100 ^d	0,00	100	100
	28	6	100 ^d	0,00	100	100
PRPa	0	6	0,00 ^a	0,00	0,00	0,00
	7	5	29,71 ^b	9,97	17,59	43,01
	14	6	68,09 ^c	10,54	56,64	81,72
	21	6	100 ^d	0,00	100	100
	28	6	100 ^d	0,00	100	100
PRPa+Membrana	0	6	0,00 ^a	0,00	0,00	0,00
	7	4	21,65 ^b	15,05	8,46	41,24
	14	6	61,87 ^c	19,49	33,35	80,12
	21	6	99,06 ^d	2,31	94,34	100
	28	6	100 ^d	0,00	100	100

n: número de observações; DP: Desvio-padrão; min: mínimo; max: máximo; letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os momentos dentro de cada tratamento.

Liu et al.⁶³, em sua revisão sistemática relata que apesar do aumento no número de ensaios de novos curativos de quitosana, os estudos sobre a relação entre quitosana e cicatrização de ferida têm sido limitados, restringindo a interpretação adequada dos resultados existentes. Destaca ainda que novas pesquisas devem ser rigorosamente delineadas para confirmar qualquer efeito clinicamente relevante da quitosana na cicatrização de feridas.

O PRPa contribui para maiores percentuais de retração das feridas do GPa (29,71%) e GMPa (21,65%) no M7, por ser uma fonte rica em fatores de crescimento e outras proteínas que possuem efeitos biológicos sinérgicos e atuam como mediadores no processo de cicatrização. Os fatores de crescimento estimulam a resposta inflamatória, angiogênese, proliferação de fibroblastos e, conseqüentemente, aumento da síntese de colágeno^{39,54,64}. Estes efeitos biológicos do

PRPa são esperados quando a concentração plaquetária deve estar acima de 4 a 6 vezes referente a concentração do sangue total⁶⁴. A contagem de plaquetas para os PRPa(s) empregados neste estudo revelou uma média de no mínimo seis vezes maior a concentração de plaquetas final em relação a inicial.

Ainda é importante destacar que os resultados dos grupos tratados GM, GPa e GMPa foram considerados positivos em relação à avaliação macroscópica, mesmo sem diferença estatística entre os grupos.

Sugere-se que membrana de quitosana/xantana/ β -glicana além de promover boa adesão, excelente hemostasia e reepitelização da ferida, reduz a coceira e apresenta ação analgésica^{14,49}, o que pode contribuir para menor movimentação dos animais nas gaiolas e menor abrasão das feridas, observados nos grupos GM e GMPa. Características hemostáticas e analgésicas^{14,18,31,51} podem ser atribuídas à carga positiva (catiônica) da quitosana, ao interagir com glóbulos vermelhos carregados negativamente; portanto, o efeito hemostático da quitosana depende da adesão eletrostática às células sanguíneas. Sua ação analgésica decorre da captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico a NH_3^+ , desenvolvendo a propriedade de absorver a bradicinina responsável pela dor local^{14,65}. Estudos apontam a ação analgésica da carboximetilquitosana empregada em feridas experimentais de ratos, monitorando por meio de ensaio imunoenzimático a concentração de bradicinina e 5-hidroxitriptofano (substâncias algogênicas potentes). Os animais tratados com carboximetilquitosana apresentaram menor concentração de bradicinina e 5-hidroxitriptofano quando comparados ao grupo controle ($p < 0,005$), indicando ação analgésica¹⁹.

Ainda, é importante destacar que a membrana polimérica facilita a adesão do PRPa a ferida, sem necessidade de reposição diária do PRPa, como demonstram outros estudos³⁹; uma vez que a membrana adere a ferida e recobre o PRPa, sem perda; além de permitir a visualização da cicatrização, uma vez que a membrana é transparente.

As diferenças entre os tratamentos para os GC, GM, GPa e GMPa, nos M7 e M14 não foram significativas, no entanto, o efeito positivo da membrana complexada (quitosana, xantana, β -glicana) e do PRPa na redução do tamanho da ferida deve ser considerado quanto ao planejamento de outros estudos para aplicação clínica. Em decorrência da diminuição da permeação da membrana a líquidos pela adição de β -glicana, sugere-se o desenvolvimento de novos estudos com a membrana complexada de quitosana e xantana sem adição da β -glicana.

Conclusão

O tratamento de feridas cirúrgicas experimentais com biocurativos como PRPa isolado ou associado a membrana complexada de quitosana, xantana e β -glicana contribuem com percentuais significativos na retração das feridas, além de oferecer um ambiente propício e indispensável para a cascata da cicatrização, como ambiente úmido, trocas gasosas e ação antibacteriana. Sugere-se para futuros estudos, a avaliação quali-quantitativa do tecido cicatricial e do colágeno.

Declaração de Conflito de Interesses

Os autores declararam não haver conflitos de interesse potenciais com respeito à pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo.

Financiamento

Os autores declararam ter recebido o seguinte apoio financeiro para a pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo: Este trabalho é financiado por: UNOESTE, UniFAI e CAPES.

Agradecimentos

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001”.

Referências

1. Souto LRM, Rehder J, Vassallo J, et al. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. *Sao Paulo Med J* 2006; 124(2): 71–6.
2. Patrulea V, Ostafe V, Borchard G, et al. Chitosan as a starting material for wound healing applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 97(Pt B): 417–426.
3. Wang PH, Huang BS, Horng HC, et al. Wound healing. *J Chin Med Assoc* 2018; 81(2): 94–101.
4. Masson-Meyers DS, Andrade TAM, Caetano GF, et al. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *Int J Exp Pathol* 2020; 101(1-2): 21–37.
5. Souto LRM, Vassallo J, Rehder J, et al. Immunohistochemical characterization of a human skin model reconstructed in vitro. *Sao Paulo Med J* 2009; 127(1): 28–33.
6. Vendramin FS, Franco D, Franco TR. Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas. *Rev Bras Cir Plást* 2010; 25(4): 589–94.
7. Reis Filho N, Ferreira M, Pascoli A, et al. Epitelização de enxertos cutâneos em feridas recentes de coelhos tratados com membrana amniótica canina e/ou laserterapia. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2017; 69(3): 603–612.
8. Meng X, Tian F, Yang J, et al. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21(5): 1751–1759.
9. Murakami K, Aoki H, Nakamura S, et al. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials* 2010; 31(1): 83–90.
10. Bellini MZ, Pires ALR, Vasconcelos MO, et al. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. *J Appl Polym Sci* 2012; 125(S2): 421–431.
11. Bellini MZ, Oliva-Neto P de, Moraes AM. Properties

- of films obtained from biopolymers of different origins for skin lesions therapy. *Brazilian Arch Biol Technol* 2015; 58(2): 289–299.
12. Burd A, Huang L. Carbohydrates and Cutaneous Wound Healing. In: *Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications*. Elsevier Science, 2008, pp.253–274.
 13. Bueno CZ, Veiga IG, Sacchetin PSC, et al. Aplicação de polissacarídeos para a produção de curativos e outros biomateriais. In: *Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados*. Imprensa da Universidade de Coimbra, 2015, pp.67–110.
 14. Alven S, Aderibigbe BA. Chitosan and Cellulose-Based Hydrogels for Wound Management. *Int J Mol Sci* 2020; 21(24): 9656.
 15. Wittaya-areekul S, Prahsarn C. Development and in vitro evaluation of chitosan-polysaccharides composite wound dressings. *Int J Pharm* 2006; 313(1–2): 123–128.
 16. Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv* 2011; 29(3): 322–337.
 17. Wang D, Zhang N, Meng G, et al. The effect of form of carboxymethyl-chitosan dressings on biological properties in wound healing. *Colloids Surf. B* 2020.
 18. Wang CH, Cherng JH, Liu CC, et al. Procoagulant and Antimicrobial Effects of Chitosan in Wound Healing. *Int J Mol Sci* 2021; 22(13): 7067.
 19. Matica MA, Aachmann FL, Tøndervik A, et al. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. *Int J Mol Sci* 2019; 20(23): 5889.
 20. Rodrigues AP, Saraiva Sanchez EM, da Costa AC, et al. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. *J Appl Polym Sci* 2008; 109(4): 2703–2710.
 21. Campos MGN, Rawls HR, Innocentini-Mei LH, et al. In vitro gentamicin sustained and controlled release from chitosan cross-linked films. *J Mater Sci Mater Med* 2009; 20(2): 537–542.
 22. Bueno CZ, Moraes AM. Development of porous lamellar chitosan-alginate membranes: Effect of different surfactants on biomaterial properties. *J Appl Polym Sci* 2011; 122(1): 624–631.
 23. Bejenariu A, Popa M, Le Cerf D, et al. Stiffness xanthan hydrogels: synthesis, swelling characteristics and controlled release properties. *Polym Bull* 2008; 61(5): 631–641.
 24. Bano I, Arshad M, Yasin T, et al. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *Int J Biol Macromol* 2017; 102: 380–383.
 25. Miura NN, Adachi Y, Yadomae T, et al. Structure and biological activities of beta-glucans from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol* 2003; 47(3): 173–182.
 26. Nakasse TSL, Cianca LOA, Damasceno YW, et al. Padronização da produção de biocurativos Dérmico-Epidérmicos de Quitosana, Xantana e Beta-Glucana. *Braz J Hea Rev* 2020; 3: 5496–5506.
 27. Khalikova TA, Zhanaeva SY, Korolenko TA, et al. Regulation of activity of cathepsins B, L, and D in murine lymphosarcoma model at a combined treatment with cyclophosphamide and yeast polysaccharide. *Cancer Lett* 2005; 223(1): 77–83.
 28. Luhm J, Langenkamp U, Hensel J, et al. Beta-(1–>3)- D-glucan modulates DNA binding of nuclear factors kappaB, AT and IL-6 leading to an anti-inflammatory shift of the IL-1beta/IL-1 receptor antagonist ratio. *BMC Immunol* 2006; 7:5.
 29. Magnani M, Castro-Gómez RJH. Beta-glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. *Semin Cienc Agrar* 2008; 29(3): 631–650.
 30. Magnani M, Castro-Gomez RJH, Mori MP, et al. Protective effect of carboxymethyl-glucan (CM-G) against DNA damage in patients with advanced prostate cancer. *Genet Mol Biol* 2011; 34(1):131–135.
 31. Sergi R, Bellucci D, Salvatori R, et al. Chitosan-Based Bioactive Glass Gauze: Microstructural Properties, In Vitro Bioactivity, and Biological Tests. *Materials (Basel)* 2020; 13(12): 2819.
 32. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2007; 20(1): 51–58.
 33. Masi ECD, Campos ACL, João De Masi FD, et al. A influência de fatores de crescimento na cicatrização de feridas cutâneas de ratas. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2016; 82(5): 512–521.
 34. Webb CA. Platelet-Rich Plasma Update: Clinical Use in Musculoskeletal Care. *J Musculoskelet Med* 2012; 29(4).
 35. Medeiros AC, Dantas-Filho AM. Cicatrização das feridas cirúrgicas. *J Surg Cl Res* 2017; 7(2): 87–102.
 36. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, et al. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J Bone Joint Surg Br* 2009; 91(8): 987–996.
 37. Costa PA, Santos P. Plasma rico em plaquetas: uma revisão sobre seu uso terapêutico. *Rev Bras Anal Clin* 2016; 48(4): 311–319.
 38. Miot HA. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. *J Vasc Bras.* 2011; 10(4): 275–278.
 39. Tetila AF, Breda MRS, Nogueira RMB, et al. The Use of Platelet-Rich Plasma and Rosuvastatin in Wound Healing in Rabbits: A Longitudinal Study. *Adv Skin Wound Care* 2019; 32(9): 1–5.
 40. Kanashiro GP, Cassu RN. Anestesia em animais selvagens e de laboratório. In: *Manual de Terapêutica Médica*. São Paulo: Roca, 2008, pp.728–745.
 41. Donatti C, Brandão CVS, Ranzani JJT, et al. Use of platelet-rich plasma in the treatment of deep corneal ulcers induced in rabbits.clinical and histomorphometric evaluation. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 2013; 65(3): 809–818.
 42. Souza M V, Pinto OJ, Costa MBM, et al. Expressão gênica do colágeno em ferida cutânea de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. *Pesqui Vet Bras* 2014; 34(3): 233–240.
 43. Ferracioli E, Laposy CB, Nogueira MR, et al. Avaliação das fibras colágenas de feridas dérmicas

- de coelhos tratadas com diferentes fontes de plasma rico em plaquetas. *Arq Bras Med Vet* 2018; 70(4): 1179–1186.
44. Ferreira NG de O, Vicentini YF, Breda MRS, et al. Uso de biomateriais e rosuvastatina tópica aumenta angiogênese de feridas cirúrgicas em coelhos. *Res Soc Dev* 2021; 10(1): e32510111327.
 45. Paolozzi RJ, Cassu RN, da Cruz FSF, et al. Diferentes doses de tramadol em cães: Ações analgésicas, sedativas e sobre o sistema cardiorrespiratório. *Cienc Rural* 2011; 41(8): 1417–1423.
 46. Nordback PH, Miettinen S, Kääriäinen M, et al. Chitosan membranes in a rat model of full-thickness cutaneous wounds: healing and IL-4 levels. *J Wound Care* 2015; 24(6): 245–251.
 47. Melo AF, Dantas V de M, Chavaglia SRR, et al. Construction, validation and reliability of an instrument for evaluation and evolution of chronic wounds. *Biosci J* 2019; 35(4): 1290–1299.
 48. Marques MEM, Laposy CB, Dos Santos Silva ML, et al. Collagen quantification in rabbit dermal wounds treated with heterologous platelet-rich plasma gel. *Semin Agrar* 2017; 38(1): 249–258.
 49. Shen S, Chen X, Shen Z, et al. Marine Polysaccharides for Wound Dressings Application: An Overview. *Pharmaceutics* 2021; 13(10): 1666.
 50. Colpas PT, Alves PCM, Oliveira CC, et al. Terapia celular combinada com membranas de biopolímeros melhora a cicatrização de úlceras em paciente com dermatomiosite juvenil. *Surg Cosmet Dermatol* 2018; 10(1): 28–35.
 51. Tang F, Lv L, Lu F, et al. Preparation and characterization of N-chitosan as a wound healing accelerator. *Int J Biol Macromol* 2016; 93(Pt A): 1295–1303.
 52. Li R, Xu Z, Jiang Q, et al. Characterization and biological evaluation of a novel silver nanoparticle-loaded collagen-chitosan dressing. *Regen Biomater* 2021; 7(4): 371–380.
 53. Taghipour N, Deravi N, Rahimi M. Chitosan-based Scaffolds, Suitable Structures for Wound Healing Dressing: A Short Review. *Regen Reconstr Restor* 2020; 5: e11.
 54. Szücs dos Santos ES, Laposy CB, Abegão KGB, et al. Assessment of the healing of standardized wounds in rabbits treated serially with autologous platelet-rich plasma gel. *Semin Cienc Agrar* 2016; 37(6): 4131–4137.
 55. Pazzini JM, Nardi ABD, Huppes RR, et al. Utilização de plasma rico em plaquetas para estimulação da angiogênese em flape de padrão axial toracodorsal em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). *Pesq Vet Bras* 2016; 36(2): 108–118.
 56. Morales-González M, Díaz LE, Dominguez-Paz C, et al. Insights into the Design of Polyurethane Dressings Suitable for the Stages of Skin Wound-Healing: A Systematic Review. *Polymers (Basel)* 2022; 14(15): 2990.
 57. Cheng J, Liu J, Li M, et al. Hydrogel-Based Biomaterials Engineered from Natural-Derived Polysaccharides and Proteins for Hemostasis and Wound Healing. *Front Bioeng Biotechnol* 2021; 9:780187.
 58. Kofuji K, Aoki A, Tsubaki K, et al. Antioxidant Activity of β -Glucan. *ISRN Pharm* 2012.
 59. Graubaus H-J, Busch R, Stier H, et al. A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Nutritional Study Using an Insoluble Yeast Beta-Glucan to Improve the Immune Defense System. *Food Nutr Sci* 2012; 3(6).
 60. Novak M, Vetvicka V. Glucans as biological response modifiers. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009; 9(1):67–75.
 61. Cianca LOA, Nakasse TSL, Damasceno YW, et al. Physical and chemical characterization of dermal-epidermal biocuratives of Chitosan, Xantan and Beta-Glucan. *Braz J Hea Rev* 2020; 3: 5631–5650
 62. Martins, E.A.N.; Invernizzi, M.S.; Campos, M.G.N, et al. Emprego de membrana de quitosana em feridas cutâneas induzidas experimentalmente em equinos. *Cienc Rural*. 2013, 43: 1824–1830
 63. Liu Y, Chen J, Li P, et al. The Effect of Chitosan in Wound Healing: A Systematic Review. *Adv Skin Wound Care* 2021; 34(5): 262–266.
 64. Pedroso ACB da R, Queiroz AKL de, Brito ESA de, et al. Autologous platelet-rich plasma action on skin autografts in horses. *Cienc Rural* 2021; 51(8): e20190811.
 65. Silva HSRC, Santos KSCR, Ferreira, EI. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova* 2006 29(4): 776–785.

ANEXO A: INSTRUÇÕES PARA AUTORES PARA SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS À REVISTA *MEDICINA* (ARTIGO A)

Instructions for Authors

Shortcuts

- [Manuscript Submission Overview](#)
- [Manuscript Preparation](#)
- [Preparing Figures, Schemes and Tables](#)
- [Original Images for Blots and Gels Requirements](#)
- [Supplementary Materials, Data Deposit and Software Source Code](#)
- [Research and Publication Ethics](#)
- [Reviewer Suggestions](#)
- [English Corrections](#)
- [Preprints and Conference Papers](#)
- [Authorship](#)
- [Editorial Independence](#)
- [Conflicts of Interest](#)
- [Editorial Procedures and Peer-Review](#)
- [Promoting Equity, Diversity and Inclusiveness Within MDPI Journals](#)
- [Resource Identification Initiative](#)

Submission Checklist

Please:

1. Read the [Aims & Scope](#) to gain an overview and assess if your manuscript is suitable for this journal;
2. Use the [Microsoft Word template](#) or [LaTeX template](#) to prepare your manuscript;
3. Make sure that issues about [publication ethics](#), [research ethics](#), [copyright](#), [authorship](#), [figure formats](#), [data](#) and [references format](#) have been appropriately considered;
4. Ensure that all authors have approved the content of the submitted manuscript.
5. Authors are encouraged to add a [biography](#) (optional) to the submission and post it to [SciProfiles](#).

Manuscript Submission Overview

Types of Publications

Full experimental details must be provided so that the results can be reproduced. *Medicina* requires that authors publish all experimental controls and make full datasets available where possible (see the guidelines on [Supplementary Materials](#) and references to unpublished data).

Manuscripts submitted to *Medicina* should neither be published previously nor be under consideration for publication in another journal. The main article types are listed below and a comprehensive list of article types can be found [here](#).

- *Article*: These are original research manuscripts. The work should report scientifically sound experiments and provide a substantial amount of new information. The article should include the most recent and relevant references in the field. The structure should include an Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and Conclusions (optional) sections, with a suggested minimum word count of 4000 words. Please refer to the journal webpages for specific instructions and templates.

- **Review:** Reviews offer a comprehensive analysis of the existing literature within a field of study, identifying current gaps or problems. They should be critical and constructive and provide recommendations for future research. No new, unpublished data should be presented. The structure can include an Abstract, Keywords, Introduction, Relevant Sections, Discussion, Conclusions, and Future Directions, with a suggested minimum word count of 4000 words.

Submission Process

Manuscripts for *Medicina* should be submitted online at susy.mdpi.com. The submitting author, who is generally the corresponding author, is responsible for the manuscript during the submission and peer-review process. The submitting author must ensure that all eligible co-authors have been included in the author list (read the [criteria to qualify for authorship](#)) and that they have all read and approved the submitted version of the manuscript. To submit your manuscript, register and log in to the [submission website](#). Once you have registered, [click here to go to the submission form for Medicina](#). All co-authors can see the manuscript details in the submission system, if they register and log in using the e-mail address provided during manuscript submission.

Accepted File Formats

Authors are encouraged to use the [Microsoft Word template](#) or [LaTeX template](#) to prepare their manuscript. Using the template file will substantially shorten the time to complete copy-editing and publication of accepted manuscripts. The total amount of data for all files must not exceed 120 MB. If this is a problem, please contact the Editorial Office medicina@mdpi.com. Accepted file formats are:

- **Microsoft Word:** Manuscripts prepared in Microsoft Word must be converted into a single file before submission. When preparing manuscripts in Microsoft Word, we encourage you to use the [Medicina Microsoft Word template file](#). Please insert your graphics (schemes, figures, etc.) in the main text after the paragraph of its first citation.
- **LaTeX:** Manuscripts prepared in LaTeX must be collated into one ZIP folder (including all source files and images, so that the Editorial Office can recompile the submitted PDF). When preparing manuscripts in LaTeX, we encourage you to use the [Medicina LaTeX template files](#). You can now also use the online application [writeLaTeX](#) to submit articles directly to *Medicina*. The MDPI LaTeX template file should be selected from the [writeLaTeX template gallery](#).
- **Supplementary files:** May be any format, but it is recommended that you use common, non-proprietary formats where possible (see [below](#) for further details).

Disclaimer: Usage of these templates is exclusively intended for submission to the journal for peer-review, and strictly limited to this purpose and it cannot be used for posting online on preprint servers or other websites.

Free Format Submission

Medicina now accepts free format submission:

- We do not have strict formatting requirements, but all manuscripts must contain the required sections: Author Information, Abstract, Keywords, Introduction, Materials & Methods, Results, Conclusions, Figures and Tables with Captions, Funding Information, Author Contributions, Conflict of Interest and other Ethics Statements. Check the Journal [Instructions for Authors](#) for more details.
- Your references may be in any style, provided that you use the consistent formatting throughout. It is essential to include author(s) name(s), journal or book title, article or chapter title (where required), year of publication, volume and issue (where appropriate) and pagination. DOI numbers (Digital Object Identifier) are not mandatory but highly encouraged. The bibliography software package *EndNote*, [Zotero](#), *Mendeley*, *Reference Manager* are recommended.
- When your manuscript reaches the revision stage, you will be requested to format the manuscript according to the journal guidelines.

Cover Letter

A cover letter must be included with each manuscript submission. It should be concise and explain why the content of the paper is significant, placing the findings in the context of existing work. It should explain why the manuscript fits the scope of the journal.

Any prior submissions of the manuscript to MDPI journals must be acknowledged. If this is the case, it is strongly recommended that the previous manuscript ID is provided in the submission system, which will ease your current submission process. The names of proposed and excluded reviewers should be provided in the submission system, not in the cover letter.

All cover letters are required to include the statements:

- We confirm that neither the manuscript nor any parts of its content are currently under consideration or published in another journal.
- All authors have approved the manuscript and agree with its submission to (journal name).

Author Biography

Authors are encouraged to add a biography (maximum 150 words) to the submission and post it to [SciProfiles](#). This should be a single paragraph and should contain the following points:

1. Authors' full names followed by current positions;
2. Education background including institution information and year of graduation (type and level of degree received);
3. Work experience;
4. Current and previous research interests;
5. Memberships of professional societies and awards received.

Note for Authors Funded by the National Institutes of Health (NIH)

This journal automatically deposits papers to PubMed Central after publication of an issue. Authors do not need to separately submit their papers through the NIH Manuscript Submission System (NIHMS, <http://nihms.nih.gov/>).

[\[Return to top\]](#)

Manuscript Preparation

General Considerations

- **Research manuscripts** should comprise:
 - **Front matter:** Title, Author list, Affiliations, Abstract, Keywords.
 - **Research manuscript sections:** Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions.
 - **Back matter:** Supplementary Materials, Acknowledgments, Author Contributions, Conflicts of Interest, [References](#).
- **Review manuscripts** should comprise the [front matter](#), literature review sections and the [back matter](#). The template file can also be used to prepare the front and back matter of your review manuscript. It is not necessary to follow the remaining structure. Structured reviews and meta-analyses should use the same structure as research articles and ensure they conform to the [PRISMA](#) guidelines.
- **Case reports** should include a succinct introduction about the general medical condition or relevant symptoms that will be discussed in the case report; the case presentation including all of the relevant de-identified demographic and descriptive information about the patient(s), and a description of the symptoms, diagnosis, treatment, and outcome; a discussion providing context and any necessary explanation of specific treatment decisions; a conclusion briefly outlining the take-home message and the lessons learned.
- **Graphical Abstract:**

A graphical abstract (GA) is an image that appears alongside the text abstract in the Table of Contents. In addition to summarizing the content, it should represent the topic of the article in an attention-grabbing way. Moreover, it should not be exactly the same as the Figure in the paper or just a simple superposition of several subfigures. Note that the GA must be original and unpublished artwork. Any postage stamps, currency from any country, or trademarked items should not be included in it.

The GA should be a high-quality illustration or diagram in any of the following formats: PNG, JPEG, TIFF, or SVG. Written text in a GA should be clear and easy to read, using one of the following fonts: Times, Arial, Courier, Helvetica, Ubuntu or Calibri.

The minimum required size for the GA is 560 × 1100 pixels (height × width). The size should be of high quality in order to reproduce well.

- **Acronyms/Abbreviations/Initialisms** should be defined the first time they appear in each of three sections: the abstract; the main text; the first figure or table. When defined for the first time, the acronym/abbreviation/initialism should be added in parentheses after the written-out form.
- **SI Units** (International System of Units) should be used. Imperial, US customary and other units should be converted to SI units whenever possible.
- **Accession numbers** of RNA, DNA and protein sequences used in the manuscript should be provided in the Materials and Methods section. Also see the section on [Deposition of Sequences and Expression Data](#).
- **Equations:** If you are using Word, please use either the Microsoft Equation Editor or the MathType add-on. Equations should be editable by the editorial office and not appear in a picture format.
- **Research Data and supplementary materials:** Note that publication of your manuscript implies that you must make all materials, data, and protocols associated with the publication available to readers. Disclose at the submission stage any restrictions on the availability of materials or information. Read the information about [Supplementary Materials](#) and Data Deposit for additional guidelines.
- **Preregistration:** Where authors have preregistered studies or analysis plans, links to the preregistration must be provided in the manuscript.
- **Guidelines and standards:** MDPI follows standards and guidelines for certain types of research. See https://www.mdpi.com/editorial_process for further information.

[\[Return to top\]](#)

Front Matter

These sections should appear in all manuscript types

- **Title:** The title of your manuscript should be concise, specific and relevant. It should identify if the study reports (human or animal) trial data, or is a systematic review, meta-analysis or replication study. When gene or protein names are included, the abbreviated name rather than full name should be used. Please do not include abbreviated or short forms of the title, such as a running title or head. These will be removed by our Editorial Office.
- **Author List and Affiliations:** Authors' full first and last names must be provided. The initials of any middle names can be added. The PubMed/MEDLINE standard format is used for affiliations: complete address information including city, zip code, state/province, and country. At least one author should be designated as the corresponding author, and their email address and other details included at the end of the affiliation section. After acceptance, updates to author names or affiliations may not be permitted. Equal Contributions: authors who have contributed equally should be marked with a superscript symbol (†). The symbol must be included below the affiliations, and the following statement added: "These authors contributed equally to this work". The equal roles of authors should also be adequately disclosed in the author contributions statement. Please read the criteria to qualify for authorship.
- **Abstract:** The abstract should be a total of about 300 words maximum. The abstract should be a single paragraph and should follow the style of structured abstracts, with headings: 1) Background and Objectives: Place the question addressed in a broad context and highlight the purpose of the study; 2) Materials and Methods: Describe briefly the main methods or treatments applied. Include

any relevant preregistration numbers, and species and strains of any animals used. 3) Results: Summarize the article's main findings; and 4) Conclusion: Indicate the main conclusions or interpretations. The abstract should be an objective representation of the article: it must not contain results which are not presented and substantiated in the main text and should not exaggerate the main conclusions.

- **Keywords:** Three to ten pertinent keywords need to be added after the abstract. We recommend that the keywords are specific to the article, yet reasonably common within the subject discipline.

Research Manuscript Sections

- **Introduction:** The introduction should briefly place the study in a broad context and highlight why it is important. It should define the purpose of the work and its significance, including specific hypotheses being tested. The current state of the research field should be reviewed carefully and key publications cited. Please highlight controversial and diverging hypotheses when necessary. Finally, briefly mention the main aim of the work and highlight the main conclusions. Keep the introduction comprehensible to scientists working outside the topic of the paper.
- **Materials and Methods:** They should be described with sufficient detail to allow others to replicate and build on published results. New methods and protocols should be described in detail while well-established methods can be briefly described and appropriately cited. Give the name and version of any software used and make clear whether computer code used is available. Include any pre-registration codes.
- **Results:** Provide a concise and precise description of the experimental results, their interpretation as well as the experimental conclusions that can be drawn.
- **Discussion:** Authors should discuss the results and how they can be interpreted in perspective of previous studies and of the working hypotheses. The findings and their implications should be discussed in the broadest context possible and limitations of the work highlighted. Future research directions may also be mentioned.
- **Conclusions:** This section is mandatory and should contain the main conclusions regarding the research.
- **Patents:** This section is not mandatory but may be added if there are patents resulting from the work reported in this manuscript.

[\[Return to top\]](#)

Back Matter

- **Supplementary Materials:** Describe any supplementary material published online alongside the manuscript (figure, tables, video, spreadsheets, etc.). Please indicate the name and title of each element as follows Figure S1: title, Table S1: title, etc.
- **Funding:** All sources of funding of the study should be disclosed. Clearly indicate grants that you have received in support of your research work and if you received funds to cover publication costs. Note that some funders will not refund article processing charges (APC) if the funder and grant number are not clearly and correctly identified in the paper. Funding information can be entered separately into the submission system by the authors during submission of their manuscript. Such funding information, if available, will be deposited to FundRef if the manuscript is finally published. Please add: "This research received no external funding" or "This research was funded by [name of funder] grant number [xxx]" and "The APC was funded by [XXX]" in this section. Check carefully that the details given are accurate and use the standard spelling of funding agency names at <https://search.crossref.org/funding>, any errors may affect your future funding.
- **Acknowledgments:** In this section you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).
- **Author Contributions:** Each author is expected to have 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; or have drafted the work or substantively revised it; AND has approved the submitted version (and version substantially edited by journal staff that involves the

author's contribution to the study); AND agrees to be personally accountable for the author's own contributions and for ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work, even ones in which the author was not personally involved, are appropriately investigated, resolved, and documented in the literature. For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used "Conceptualization, X.X. and Y.Y.; Methodology, X.X.; Software, X.X.; Validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.; Formal Analysis, X.X.; Investigation, X.X.; Resources, X.X.; Data Curation, X.X.; Writing – Original Draft Preparation, X.X.; Writing – Review & Editing, X.X.; Visualization, X.X.; Supervision, X.X.; Project Administration, X.X.; Funding Acquisition, Y.Y.", please turn to the [CRediT taxonomy](#) for the term explanation. For more background on CRediT, see [here](#). **"Authorship must include and be limited to those who have contributed substantially to the work. Please read the section concerning the [criteria to qualify for authorship](#) carefully".**

- **Institutional Review Board Statement:** In this section, please add the Institutional Review Board Statement and approval number for studies involving humans or animals. Please note that the Editorial Office might ask you for further information. Please add "The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of NAME OF INSTITUTE (protocol code XXX and date of approval)." OR "Ethical review and approval were waived for this study, due to REASON (please provide a detailed justification)." OR "Not applicable" for studies not involving humans or animals. You might also choose to exclude this statement if the study did not involve humans or animals.
- **Informed Consent Statement:** Any research article describing a study involving humans should contain this statement. Please add "Informed consent was obtained from all subjects involved in the study." OR "Patient consent was waived due to REASON (please provide a detailed justification)." OR "Not applicable" for studies not involving humans. You might also choose to exclude this statement if the study did not involve humans. Written informed consent for publication must be obtained from participating patients who can be identified (including by the patients themselves). Please state "Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper" if applicable.
- **Data Availability Statement:** In this section, please provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study. Please refer to suggested Data Availability Statements in section "[MDPI Research Data Policies](#)". You might choose to exclude this statement if the study did not report any data.
- **Conflicts of Interest:** Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be perceived as influencing the representation or interpretation of reported research results. If there is no conflict of interest, please state "The authors declare no conflict of interest." Any role of the funding sponsors in the choice of research project; design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results must be declared in this section. *Medicina* does not publish studies funded partially or fully by the tobacco industry. Any projects funded by industry must pay special attention to the full declaration of funder involvement. If there is no role, please state "The sponsors had no role in the design, execution, interpretation, or writing of the study". For more details please see [Conflict of Interest](#).
- **References:** References must be numbered in order of appearance in the text (including table captions and figure legends) and listed individually at the end of the manuscript. We recommend preparing the references with a bibliography software package, such as [EndNote](#), [ReferenceManager](#) or [Zotero](#) to avoid typing mistakes and duplicated references. We encourage citations to data, computer code and other citable research material. If available online, you may use reference style 9. below.
- Citations and References in Supplementary files are permitted provided that they also appear in the main text and in the reference list.

In the text, reference numbers should be placed in square brackets [], and placed before the punctuation; for example [1], [1–3] or [1,3]. For embedded citations in the text with pagination, use both parentheses and brackets to indicate the reference number and page numbers; for example [5] (p. 10). or [6] (pp. 101–105).

The reference list should include the full title, as recommended by the ACS style guide. Style files for [Endnote](#) and [Zotero](#) are available.

References should be described as follows, depending on the type of work:

- Journal Articles:

1. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. *Abbreviated Journal Name* **Year**, *Volume*, page range.

- Books and Book Chapters:

2. Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, Year; pp. 154–196.

3. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, A., Editor 2, B., Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, Year; Volume 3, pp. 154–196.

- Unpublished materials intended for publication:

4. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work (optional). Correspondence Affiliation, City, State, Country. year, *status (manuscript in preparation; to be submitted)*.

5. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. *Abbreviated Journal Name* year, *phrase indicating stage of publication (submitted; accepted; in press)*.

- Unpublished materials not intended for publication:

6. Author 1, A.B. (Affiliation, City, State, Country); Author 2, C. (Affiliation, City, State, Country). Phase describing the material, year. (phase: Personal communication; Private communication; Unpublished work; etc.)

- Conference Proceedings:

7. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In *Title of the Collected Work* (if available), Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference; Editor 1, Editor 2, Eds. (if available); Publisher: City, Country, Year (if available); Abstract Number (optional), Pagination (optional).

- Thesis:

8. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.

- Websites:

9. Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year).

Unlike published works, websites may change over time or disappear, so we encourage you create an archive of the cited website using a service such as [WebCite](#). Archived websites should be cited using the link provided as follows:

10. Title of Site. URL (archived on Day Month Year).

See the [Reference List and Citations Guide](#) for more detailed information.

[\[Return to top\]](#)

Preparing Figures, Schemes and Tables

- File for Figures and Schemes must be provided during submission in a single zip archive and at a sufficiently high resolution (minimum 1000 pixels width/height, or a resolution of 300 dpi or higher). Common formats are accepted, however, TIFF, JPEG, EPS and PDF are preferred.
- *Medicina* can publish multimedia files in articles or as supplementary materials. Please contact the editorial office for further information.
- All Figures, Schemes and Tables should be inserted into the main text close to their first citation and must be numbered following their number of appearance (Figure 1, Scheme I, Figure 2, Scheme II, Table 1, etc.).
- All Figures, Schemes and Tables should have a short explanatory title and caption.
- All table columns should have an explanatory heading. To facilitate the copy-editing of larger tables, smaller fonts may be used, but no less than 8 pt. in size. Authors should use the Table option of Microsoft Word to create tables.
- Authors are encouraged to prepare figures and schemes in color (RGB at 8-bit per channel). There is no additional cost for publishing full color graphics.

[\[Return to top\]](#)

Original Images for Blots and Gels Requirements

For the main text, please ensure that:

- All experimental samples and controls used for one comparative analysis are run on the same blot/gel.
- Image processing methods, such as adjusting the brightness or contrast, do not alter or distort the information in the figure and are applied to every pixel. High-contrast blots/gels are discouraged.
- Cropped blots/gels present in the main text retain all important information and bands.
- You have checked figures for duplications and ensured the figure legends are clear and accurate. Please include all relevant information in the figure legends and clearly indicate any re-arrangement of lanes.

In order to ensure the integrity and scientific validity of blots (including, but not limited to, Western blots) and the reporting of gel data, original, uncropped and unadjusted images should be uploaded as Supporting Information files at the time of initial submission.

A single PDF file or a zip folder including all the original images reported in the main figure and supplemental figures should be prepared. Authors should annotate each original image, corresponding to the figure in the main article or supplementary materials, and label each lane or loading order. All experimental samples and controls used for one comparative analysis should be run on the same blot/gel image. For quantitative analyses, please provide the blots/gels for each independent biological replicate used in the analysis.

[\[Return to top\]](#)

Supplementary Materials, Data Deposit and Software Source Code

MDPI Research Data Policies

MDPI is committed to supporting open scientific exchange and enabling our authors to achieve best practices in sharing and archiving research data. We encourage all authors of articles published in MDPI journals to share their research data. Individual journal guidelines can be found at the journal 'Instructions for Authors' page. Data sharing policies concern the minimal dataset that supports the central findings of a published study. Generated data should be publicly available and cited in accordance with journal guidelines.

MDPI data policies are informed by [TOP Guidelines](#) and [FAIR Principles](#).

Where ethical, legal or privacy issues are present, data should not be shared. The authors should make any limitations clear in the Data Availability Statement upon submission. Authors should ensure that data shared are in accordance with consent provided by participants on the use of confidential data.

Data Availability Statements provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study.

Below are suggested Data Availability Statements:

- Data available in a publicly accessible repository
The data presented in this study are openly available in [repository name e.g., FigShare] at [\[doi\]](#), reference number [reference number].
- Data available in a publicly accessible repository that does not issue DOIs
Publicly available datasets were analyzed in this study. This data can be found here: [link/accession number]
- Data available on request due to restrictions eg privacy or ethical
The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to [insert reason here]
- 3rd Party Data
Restrictions apply to the availability of these data. Data was obtained from [third party] and are available [from the authors / at URL] with the permission of [third party].
- Data sharing not applicable
No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

- Data is contained within the article or supplementary material. The data presented in this study are available in [insert article or supplementary material here]

Data citation:

- [dataset] Authors. Year. Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent identifier (e.g., DOI).

Computer Code and Software

For work where novel computer code was developed, authors should release the code either by depositing in a recognized, public repository such as [GitHub](#) or uploading as supplementary information to the publication. The name, version, corporation and location information for all software used should be clearly indicated. Please include all the parameters used to run software/programs analyses.

Supplementary Material

Additional data and files can be uploaded as "Supplementary Files" during the manuscript submission process. The supplementary files will also be available to the referees as part of the peer-review process. Any file format is acceptable; however, we recommend that common, non-proprietary formats are used where possible. For more information on supplementary materials, please refer to https://www.mdpi.com/authors/layout#_bookmark83.

References in Supplementary Files

Citations and References in Supplementary files are permitted provided that they also appear in the reference list of the main text.

Unpublished Data

Restrictions on data availability should be noted during submission and in the manuscript. "Data not shown" should be avoided: authors are encouraged to publish all observations related to the submitted manuscript as Supplementary Material. "Unpublished data" intended for publication in a manuscript that is either planned, "in preparation" or "submitted" but not yet accepted, should be cited in the text and a reference should be added in the References section. "Personal Communication" should also be cited in the text and reference added in the References section. (see also the MDPI reference list and citations style guide).

Remote Hosting and Large Data Sets

Data may be deposited with specialized service providers or institutional/subject repositories, preferably those that use the DataCite mechanism. Large data sets and files greater than 60 MB must be deposited in this way. For a list of other repositories specialized in scientific and experimental data, please consult [databib.org](#) or [re3data.org](#). The data repository name, link to the data set (URL) and accession number, doi or handle number of the data set must be provided in the paper. The journal [Data](#) also accepts submissions of data set papers.

Deposition of Sequences and Expression Data

New sequence information must be deposited to the appropriate database prior to submission of the manuscript. Accession numbers provided by the database should be included in the submitted manuscript. Manuscripts will not be published until the accession number is provided.

- *New nucleic acid sequences* must be deposited into an acceptable repository such as [GenBank](#), [EMBL](#), or [DDBJ](#). Sequences should be submitted to only one database.
- *New high throughput sequencing (HTS) datasets* (RNA-seq, ChIP-Seq, degradome analysis, ...) must be deposited either in the [GEO database](#) or in the NCBI's [Sequence Read Archive \(SRA\)](#).
- *New microarray data* must be deposited either in the [GEO](#) or the [ArrayExpress](#) databases. The "Minimal Information About a Microarray Experiment" (MIAME) guidelines published by the Microarray Gene Expression Data Society must be followed.
- *New protein sequences* obtained by protein sequencing must be submitted to UniProt (submission tool [SPIN](#)). Annotated protein structure and its reference sequence must be submitted to [RCSB of Protein Data Bank](#).

All sequence names and the accession numbers provided by the databases must be provided in the Materials and Methods section of the article.

Deposition of Proteomics Data

Methods used to generate the proteomics data should be described in detail and we encourage authors to adhere to the "[Minimum Information About a Proteomics Experiment](#)". All generated mass spectrometry raw data must be deposited in the appropriate public database such as [ProteomeXchange](#), [PRIDE](#) or [jPOST](#). At the time of submission, please include all relevant information in the materials and methods section, such as repository where the data was submitted and link, data set identifier, username and password needed to access the data.

[\[Return to top\]](#)

Research and Publication Ethics

Research Ethics

Research Involving Human Subjects

When reporting on research that involves human subjects, human material, human tissues, or human data, authors must declare that the investigations were carried out following the rules of the Declaration of Helsinki of 1975 (<https://www.wma.net/what-we-do/medical-ethics/declaration-of-helsinki/>), revised in 2013. According to point 23 of this declaration, an approval from the local institutional review board (IRB) or other appropriate ethics committee must be obtained before undertaking the research to confirm the study meets national and international guidelines. As a minimum, a statement including the project identification code, date of approval, and name of the ethics committee or institutional review board must be stated in Section 'Institutional Review Board Statement' of the article.

Example of an ethical statement: "All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of XXX (Project identification code)."

For non-interventional studies (e.g. surveys, questionnaires, social media research), all participants must be fully informed if the anonymity is assured, why the research is being conducted, how their data will be used and if there are any risks associated. As with all research involving humans, ethical approval from an appropriate ethics committee must be obtained prior to conducting the study. If ethical approval is not required, authors must either provide an exemption from the ethics committee or are encouraged to cite the local or national legislation that indicates ethics approval is not required for this type of study. Where a study has been granted exemption, the name of the ethics committee which provided this should be stated in Section 'Institutional Review Board Statement' with a full explanation regarding why ethical approval was not required.

A written informed consent for publication must be obtained from participating patients. Data relating to individual participants must be described in detail, but private information identifying participants need not be included unless the identifiable materials are of relevance to the research (for example, photographs of participants' faces that show a particular symptom). Patients' initials or other personal identifiers must not appear in any images. For manuscripts that include any case details, personal information, and/or images of patients, authors must obtain signed informed consent for publication from patients (or their relatives/guardians) before submitting to an MDPI journal. Patient details must be anonymized as far as possible, e.g., do not mention specific age, ethnicity, or occupation where they are not relevant to the conclusions. A [template permission form](#) is available to download. A blank version of the form used to obtain permission (without the patient names or signature) must be uploaded with your submission. Editors reserve the right to reject any submission that does not meet these requirements.

You may refer to our sample form and provide an appropriate form after consulting with your affiliated institution. For the purposes of publishing in MDPI journals, a consent, permission, or release form should include unlimited permission for publication in all formats (including print, electronic, and online), in sublicensed and reprinted versions (including translations and derived works), and in other works and products under open access license. To respect patients' and any other individual's privacy, please do not send signed forms. The journal reserves the right to ask authors to provide signed forms if necessary.

If the study reports research involving vulnerable groups, an additional check may be performed. The submitted manuscript will be scrutinized by the editorial office and upon request, documentary evidence (blank consent forms and any related discussion documents from the ethics board) must be supplied.

Additionally, when studies describe groups by race, ethnicity, gender, disability, disease, etc., explanation regarding why such categorization was needed must be clearly stated in the article.

Ethical Guidelines for the Use of Animals in Research

The editors will require that the benefits potentially derived from any research causing harm to animals are significant in relation to any cost endured by animals, and that procedures followed are unlikely to cause offense to the majority of readers. Authors should particularly ensure that their research complies with the commonly-accepted '3Rs [1]':

- Replacement of animals by alternatives wherever possible,
- Reduction in number of animals used, and
- Refinement of experimental conditions and procedures to minimize the harm to animals.

Authors must include details on housing, husbandry and pain management in their manuscript.

For further guidance authors should refer to the Code of Practice for the Housing and Care of Animals Used in Scientific Procedures [2], American Association for Laboratory Animal Science [3] or European Animal Research Association [4].

If national legislation requires it, studies involving vertebrates or higher invertebrates must only be carried out after obtaining approval from the appropriate ethics committee. As a minimum, the project identification code, date of approval and name of the ethics committee or institutional review board should be stated in Section 'Institutional Review Board Statement'. Research procedures must be carried out in accordance with national and institutional regulations. Statements on animal welfare should confirm that the study complied with all relevant legislation. Clinical studies involving animals and interventions outside of routine care require ethics committee oversight as per the American Veterinary Medical Association. If the study involved client-owned animals, informed client consent must be obtained and certified in the manuscript report of the research. Owners must be fully informed if there are any risks associated with the procedures and that the research will be published. If available, a high standard of veterinary care must be provided. Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript.

If ethical approval is not required by national laws, authors must provide an exemption from the ethics committee, if one is available. Where a study has been granted exemption, the name of the ethics committee that provided this should be stated in Section 'Institutional Review Board Statement' with a full explanation on why the ethical approval was not required.

If no animal ethics committee is available to review applications, authors should be aware that the ethics of their research will be evaluated by reviewers and editors. Authors should provide a statement justifying the work from an ethical perspective, using the same utilitarian framework that is used by ethics committees. Authors may be asked to provide this even if they have received ethical approval.

MDPI endorses the ARRIVE guidelines (arriveguidelines.org/) for reporting experiments using live animals. Authors and reviewers must use the ARRIVE guidelines as a checklist, which can be found at <https://arriveguidelines.org/sites/arrive/files/documents/ARRIVE%20Compliance%20Questionnaire.pdf>. Editors reserve the right to ask for the checklist and to reject submissions that do not adhere to these guidelines, to reject submissions based on ethical or animal welfare concerns or if the procedure described does not appear to be justified by the value of the work presented.

1. NSW Department of Primary Industries and Animal Research Review Panel. Three Rs. Available online: <https://www.animaletics.org.au/three-rs>
2. Home Office. Animals (Scientific Procedures) Act 1986. Code of Practice for the Housing and Care of Animals Bred, Supplied or Used for Scientific Purposes. Available online: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/388535/CoPanimalsWeb.pdf
3. American Association for Laboratory Animal Science. The Scientific Basis for Regulation of Animal Care and Use. Available online: <https://www.aalas.org/about-aalas/position-papers/scientific-basis-for-regulation-of-animal-care-and-use>
4. European Animal Research Association. EU regulations on animal research. Available online: <https://www.eara.eu/animal-research-law>

Research Involving Cell Lines

Methods sections for submissions reporting on research with cell lines should state the origin of any cell lines. For established cell lines the provenance should be stated and references must also be given to either a published paper or to a commercial source. If previously unpublished *de novo* cell lines were used, including those gifted from another laboratory, details of institutional review board or ethics committee approval must be given, and confirmation of written informed consent must be provided if the line is of human origin.

An example of Ethical Statements:

The HCT116 cell line was obtained from XXXX. The MLH1⁺ cell line was provided by XXXXX, Ltd. The DLD-1 cell line was obtained from Dr. XXXX. The DR-GFP and SA-GFP reporter plasmids were obtained from Dr. XXX and the Rad51K133A expression vector was obtained from Dr. XXXX.

Research Involving Plants

Experimental research on plants (either cultivated or wild) including collection of plant material, must comply with institutional, national, or international guidelines. We recommend that authors comply with the [Convention on Biological Diversity](#) and the [Convention on the Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora](#).

For each submitted manuscript supporting genetic information and origin must be provided. For research manuscripts involving rare and non-model plants (other than, e.g., *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, *Oryza sativa*, or many other typical model plants), voucher specimens must be deposited in an accessible herbarium or museum. Vouchers may be requested for review by future investigators to verify the identity of the material used in the study (especially if taxonomic rearrangements occur in the future). They should include details of the populations sampled on the site of collection (GPS coordinates), date of collection, and document the part(s) used in the study where appropriate. For rare, threatened or endangered species this can be waived but it is necessary for the author to describe this in the cover letter.

Editors reserve the rights to reject any submission that does not meet these requirements.

An example of Ethical Statements:

Torenia fournieri plants were used in this study. White-flowered Crown White (CrW) and violet-flowered Crown Violet (CrV) cultivars selected from 'Crown Mix' (XXX Company, City, Country) were kindly provided by Dr. XXX (XXX Institute, City, Country).

Arabidopsis mutant lines (SALKxxxx, SAILxxxx,...) were kindly provided by Dr. XXX, institute, city, country).

Clinical Trials Registration

Registration

MDPI follows the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [guidelines](#) which require and recommend registration of clinical trials in a public trials registry at or before the time of first patient enrollment as a condition of consideration for publication.

Purely observational studies do not require registration. A clinical trial not only refers to studies that take place in a hospital or involve pharmaceuticals, but also refer to all studies which involve participant randomization and group classification in the context of the intervention under assessment.

Authors are strongly encouraged to pre-register clinical trials with an international clinical trials register and cite a reference to the registration in the Methods section. Suitable databases include [clinicaltrials.gov](#), [the EU Clinical Trials Register](#) and those listed by the World Health Organisation [International Clinical Trials Registry Platform](#).

Approval to conduct a study from an independent local, regional, or national review body is not equivalent to prospective clinical trial registration. MDPI reserves the right to decline any paper without trial registration for further peer-review. However, if the study protocol has been published before the enrolment, the registration can be waived with correct citation of the published protocol.

CONSORT Statement

MDPI requires a completed CONSORT 2010 [checklist](#) and [flow diagram](#) as a condition of submission when reporting the results of a randomized trial. Templates for these can be found here or on the CONSORT

website (<http://www.consort-statement.org>) which also describes several CONSORT checklist extensions for different designs and types of data beyond two group parallel trials. At minimum, your article should report the content addressed by each item of the checklist.

[\[Return to top\]](#)

Sex and Gender in Research

We encourage our authors to follow the '[Sex and Gender Equity in Research – SAGER – guidelines](#)' and to include sex and gender considerations where relevant. Authors should use the terms sex (biological attribute) and gender (shaped by social and cultural circumstances) carefully in order to avoid confusing both terms. Article titles and/or abstracts should indicate clearly what sex(es) the study applies to. Authors should also describe in the background, whether sex and/or gender differences may be expected; report how sex and/or gender were accounted for in the design of the study; provide disaggregated data by sex and/or gender, where appropriate; and discuss respective results. If a sex and/or gender analysis was not conducted, the rationale should be given in the Discussion. We suggest that our authors consult the full [guidelines](#) before submission.

[\[Return to top\]](#)

Borders and Territories

Potential disputes over borders and territories may have particular relevance for authors in describing their research or in an author or editor correspondence address, and should be respected. Content decisions are an editorial matter and where there is a potential or perceived dispute or complaint, the editorial team will attempt to find a resolution that satisfies parties involved.

MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Publication Ethics Statement

Medicina is a member of the Committee on Publication Ethics ([COPE](#)). We fully adhere to its [Code of Conduct](#) and to its [Best Practice Guidelines](#).

The editors of this journal enforce a rigorous peer-review process together with strict ethical policies and standards to ensure to add high quality scientific works to the field of scholarly publication. Unfortunately, cases of plagiarism, data falsification, image manipulation, inappropriate authorship credit, and the like, do arise. The editors of *Medicina* take such publishing ethics issues very seriously and are trained to proceed in such cases with a zero tolerance policy.

Authors wishing to publish their papers in *Medicina* must abide to the following:

- Any facts that might be perceived as a possible conflict of interest of the author(s) must be disclosed in the paper prior to submission.
- Authors should accurately present their research findings and include an objective discussion of the significance of their findings.
- Data and methods used in the research need to be presented in sufficient detail in the paper, so that other researchers can replicate the work.
- Raw data should preferably be publicly deposited by the authors before submission of their manuscript. Authors need to at least have the raw data readily available for presentation to the referees and the editors of the journal, if requested. Authors need to ensure appropriate measures are taken so that raw data is retained in full for a reasonable time after publication.
- Simultaneous submission of manuscripts to more than one journal is not tolerated.
- The journal accepts exact translations of previously published work. All submissions of translations must conform with our [policies on translations](#).
- If errors and inaccuracies are found by the authors after publication of their paper, they need to be promptly communicated to the editors of this journal so that appropriate actions can be taken. Please refer to our [policy regarding Updating Published Papers](#).
- Your manuscript should not contain any information that has already been published. If you include already published figures or images, please obtain the necessary permission from the copyright

holder to publish under the CC-BY license. For further information, see the [Rights and Permissions](#) page.

- Plagiarism, data fabrication and image manipulation are not tolerated.
 - **Plagiarism is not acceptable** in *Medicina* submissions.
Plagiarism includes copying text, ideas, images, or data from another source, even from your own publications, without giving any credit to the original source.

Reuse of text that is copied from another source must be between quotes and the original source must be cited. If a study's design or the manuscript's structure or language has been inspired by previous works, these works must be explicitly cited.

All MDPI submissions are checked for plagiarism using the industry standard software iThenticate. If plagiarism is detected during the peer review process, the manuscript may be rejected. If plagiarism is detected after publication, an investigation will take place and action taken in accordance with our policies.

- **Image files must not be manipulated or adjusted in any way** that could lead to misinterpretation of the information provided by the original image.

Irregular manipulation includes: 1) introduction, enhancement, moving, or removing features from the original image; 2) grouping of images that should obviously be presented separately (e.g., from different parts of the same gel, or from different gels); or 3) modifying the contrast, brightness or color balance to obscure, eliminate or enhance some information.

If irregular image manipulation is identified and confirmed during the peer review process, we may reject the manuscript. If irregular image manipulation is identified and confirmed after publication, we may correct or retract the paper.

Our in-house editors will investigate any allegations of publication misconduct and may contact the authors' institutions or funders if necessary. If evidence of misconduct is found, appropriate action will be taken to correct or retract the publication. Authors are expected to comply with the best ethical publication practices when publishing with MDPI.

Citation Policy

Authors should ensure that where material is taken from other sources (including their own published writing) the source is clearly cited and that where appropriate permission is obtained.

Authors should not engage in excessive self-citation of their own work.

Authors should not copy references from other publications if they have not read the cited work.

Authors should not preferentially cite their own or their friends', peers', or institution's publications.

Authors should not cite advertisements or advertorial material.

In accordance with COPE guidelines, we expect that "original wording taken directly from publications by other researchers should appear in quotation marks with the appropriate citations." This condition also applies to an author's own work. COPE have produced a discussion document on [citation manipulation](#) with recommendations for best practice.

[\[Return to top\]](#)

Reviewer Suggestions

During the submission process, please suggest five potential reviewers with the appropriate expertise to review the manuscript. The editors will not necessarily approach these referees. Please provide detailed contact information (address, homepage, phone, e-mail address). The proposed referees should neither be current collaborators of the co-authors nor have published with any of the co-authors of the manuscript within the last five years. Proposed reviewers should be from different institutions to the authors. You may identify appropriate Editorial Board members of the journal as potential reviewers. You may suggest reviewers from among the authors that you frequently cite in your paper.

[\[Return to top\]](#)

English Corrections

To facilitate proper peer-reviewing of your manuscript, it is essential that it is submitted in grammatically correct English. Advice on some specific language points can be found [here](#).

MDPI provides minor English editing by native English speakers for all accepted papers, included in the APC. The APC does not cover extensive English editing. Your paper could be returned to you at the English editing stage of the publication process if extensive editing is required. You may choose to use a paid language-editing service, such as MDPI's [Author Services](#), before submitting your paper for publication. If you use an alternative service that provides a confirmation certificate, please send a copy to the Editorial Office. Authors from economically developing countries or nations should consider registration with [AuthorAid](#), a global research community that provides networking, mentoring, resources and training for researchers.

[\[Return to top\]](#)

Preprints and Conference Papers

Medicina accepts submissions that have previously been made available as preprints provided that they have not undergone peer review. A preprint is a draft version of a paper made available online before submission to a journal.

MDPI operates *Preprints*, a preprint server to which submitted papers can be uploaded directly after completing journal submission. Note that *Preprints* operates independently of the journal and posting a preprint does not affect the peer review process. Check the *Preprints* [instructions for authors](#) for further information.

Expanded and high-quality conference papers can be considered as articles if they fulfill the following requirements: (1) the paper should be expanded to the size of a research article; (2) the conference paper should be cited and noted on the first page of the paper; (3) if the authors do not hold the copyright of the published conference paper, authors should seek the appropriate permission from the copyright holder; (4) authors are asked to disclose that it is conference paper in their cover letter and include a statement on what has been changed compared to the original conference paper. *Medicina* does not publish pilot studies or studies with inadequate statistical power.

Unpublished conference papers that do not meet the above conditions are recommended to be submitted to the [Proceedings Series journals](#).

[\[Return to top\]](#)

Authorship

MDPI follows the International Committee of Medical Journal Editors ([ICMJE](#)) guidelines which state that, in order to qualify for authorship of a manuscript, the following criteria should be observed:

- Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
- Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
- Final approval of the version to be published; AND
- Agreement 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.

Those who contributed to the work but do not qualify for authorship should be listed in the acknowledgments. More detailed guidance on authorship is given by the [International Council of Medical Journal Editors \(ICMJE\)](#).

Any change to the author list should be approved by all authors including any who have been removed from the list. The corresponding author should act as a point of contact between the editor and the other authors and should keep co-authors informed and involve them in major decisions about the publication. We reserve the right to request confirmation that all authors meet the authorship conditions.

For more details about authorship please check [MDPI ethics website](#).

Reviewers Recommendation

Authors can recommend potential reviewers. Journal editors will check to make sure there are no conflicts of interest before contacting those reviewers, and will not consider those with competing interests. Reviewers are asked to declare any conflicts of interest. Authors can also enter the names of potential peer reviewers they wish to exclude from consideration in the peer review of their manuscript, during the initial submission progress. The editorial team will respect these requests so long as this does not interfere with the objective and thorough assessment of the submission.

Editorial Independence

Lack of Interference With Editorial Decisions

Editorial independence is of utmost importance and MDPI does not interfere with editorial decisions. All articles published by MDPI are peer reviewed and assessed by our independent editorial boards, and MDPI staff are not involved in decisions to accept manuscripts. When making an editorial decision, we expect the academic editor to make their decision based only upon:

- The suitability of selected reviewers;
- Adequacy of reviewer comments and author response;
- Overall scientific quality of the paper.

In all of our journals, in every aspect of operation, MDPI policies are informed by the mission to make science and research findings open and accessible as widely and rapidly as possible.

Editors and Editorial Staff as Authors

Editorial staff or editors shall not be involved in processing their own academic work. Submissions authored by editorial staff/editors will be assigned to at least two independent outside reviewers. Decisions will be made by other Editorial Board Members who do not have a conflict of interest with the author. Journal staff are not involved in the processing of their own work submitted to any MDPI journals.

Conflicts of Interest

According to The International Committee of Medical Journal Editors, “Authors should avoid entering into agreements with study sponsors, both for-profit and non-profit, that interfere with authors’ access to all of the study’s data or that interfere with their ability to analyze and interpret the data and to prepare and publish manuscripts independently when and where they choose.”

All authors must disclose all relationships or interests that could inappropriately influence or bias their work. Examples of potential conflicts of interest include but are not limited to financial interests (such as membership, employment, consultancies, stocks/shares ownership, honoraria, grants or other funding, paid expert testimonies and patent-licensing arrangements) and non-financial interests (such as personal or professional relationships, affiliations, personal beliefs).

Authors can disclose potential conflicts of interest via the online submission system during the submission process. Declarations regarding conflicts of interest can also be collected via the [MDPI disclosure form](#). The corresponding author must include a summary statement in the manuscript in a separate section “Conflicts of Interest” placed just before the reference list. The statement should reflect all the collected potential conflicts of interest disclosures in the form.

See below for examples of disclosures:

Conflicts of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stocks in Company Y. Author C has been involved as a consultant and expert witness in Company Z. Author D is the inventor of patent X.

If no conflicts exist, the authors should state:

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

[\[Return to top\]](#)

Editorial Procedures and Peer-Review

Initial Checks

All submitted manuscripts received by the Editorial Office will be checked by a professional in-house *Managing Editor* to determine whether they are properly prepared and whether they follow the ethical policies of the journal, including those for human and animal experimentation. Manuscripts that do not fit the journal's ethics policy or do not meet the standards of the journal will be rejected before peer-review. Manuscripts that are not properly prepared will be returned to the authors for revision and resubmission. After these checks, the *Managing Editor* will consult the journals' *Editor-in-Chief* or *Associate Editors* to determine whether the manuscript fits the scope of the journal and whether it is scientifically sound. No judgment on the potential impact of the work will be made at this stage. Reject decisions at this stage will be verified by the *Editor-in-Chief*.

Peer-Review

Once a manuscript passes the initial checks, it will be assigned to at least two independent experts for peer-review. A single-blind review is applied, where authors' identities are known to reviewers. Peer review comments are confidential and will only be disclosed with the express agreement of the reviewer.

In the case of regular submissions, in-house assistant editors will invite experts, including recommendations by an academic editor. These experts may also include *Editorial Board Members* and Guest Editors of the journal. Potential reviewers suggested by the authors may also be considered. Reviewers should not have published with any of the co-authors during the past three years and should not currently work or collaborate with any of the institutions of the co-authors of the submitted manuscript.

Optional Open Peer-Review

The journal operates optional open peer-review: *Authors are given the option for all review reports and editorial decisions to be published alongside their manuscript. In addition, reviewers can sign their review, i.e., identify themselves in the published review reports.* Authors can alter their choice for open review at any time before publication, but once the paper has been published changes will only be made at the discretion of the *Publisher* and *Editor-in-Chief*. We encourage authors to take advantage of this opportunity as proof of the rigorous process employed in publishing their research. To guarantee impartial refereeing, the names of referees will be revealed only if the referees agree to do so, and after a paper has been accepted for publication.

Editorial Decision and Revision

All the articles, reviews and communications published in MDPI journals go through the peer-review process and receive at least two reviews. The in-house editor will communicate the decision of the academic editor, which will be one of the following:

- *Accept* *after* *Minor* *Revisions:*
The paper is in principle accepted after revision based on the reviewer's comments. Authors are given five days for minor revisions.
- *Reconsider* *after* *Major* *Revisions:*
The acceptance of the manuscript would depend on the revisions. The author needs to provide a point by point response or provide a rebuttal if some of the reviewer's comments cannot be revised. A maximum of two rounds of major revision per manuscript is normally provided. Authors will be asked to resubmit the revised paper within a suitable time frame, and the revised version will be returned to the reviewer for further comments. If the required revision time is estimated to be longer than 2 months, we will recommend that authors withdraw their manuscript before resubmitting so as to avoid unnecessary time pressure and to ensure that all manuscripts are sufficiently revised.
- *Reject* *and* *Encourage* *Resubmission:*
If additional experiments are needed to support the conclusions, the manuscript will be rejected and the authors will be encouraged to re-submit the paper once further experiments have been conducted.
- *Reject:*
The article has serious flaws, and/or makes no original significant contribution. No offer of resubmission to the journal is provided.

All reviewer comments should be responded to in a point-by-point fashion. Where the authors disagree with a reviewer, they must provide a clear response.

Author Appeals

Authors may appeal a rejection by sending an e-mail to the Editorial Office of the journal. The appeal must provide a detailed justification, including point-by-point responses to the reviewers' and/or Editor's comments using an [appeal form](#). Appeals can only be submitted following a "reject and decline resubmission" decision and should be submitted within three months from the decision date. Failure to meet these criteria will result in the appeal not being considered further. The *Managing Editor* will forward the manuscript and related information (including the identities of the referees) to a designated *Editorial Board Member*. The Academic Editor being consulted will be asked to provide an advisory recommendation on the manuscript and may recommend acceptance, further peer-review, or uphold the original rejection decision. This decision will then be validated by the *Editor-in-Chief*. A reject decision at this stage is final and cannot be reversed.

Production and Publication

Once accepted, the manuscript will undergo professional copy-editing, English editing, proofreading by the authors, final corrections, pagination, and, publication on the www.mdpi.com website.

[\[Return to top\]](#)

Promoting Equity, Diversity and Inclusiveness Within MDPI Journals

Our Managing Editors encourage the Editors-in-Chief and Associate Editors to appoint diverse expert Editorial Boards. This is also reflective in our multi-national and inclusive workplace. We are proud to create equal opportunities without regard to gender, ethnicity, sexual orientation, age, religion, or socio-economic status. There is no place for discrimination in our workplace and editors of MDPI journals are to uphold these principles in high regard.

[\[Return to top\]](#)

Resource Identification Initiative

To improve the reproducibility of scientific research, the [Resource Identification Initiative](#) aims to provide unique persistent identifiers for key biological resources, including antibodies, cell lines, model organisms and tools.

We encourage authors to include unique identifiers - RRIDs- provided by the [Resource Identification Portal](#) in the dedicated section of the manuscript.

To help authors quickly find the correct identifiers for their materials, there is a single [website](#) where all resource types can be found and a 'cite this' button next to each resource, that contains a proper citation text that should be included in the methods section of the manuscript.

ANEXO B: DIRETRIZES PARA SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS À REVISTA *JOURNAL OF BIOMATERIALS APPLICATIONS* (ARTIGO B)

Manuscript Submission Guidelines: *Journal of Biomaterials Applications*

This Journal is a member of the [Committee on Publication Ethics](#).

Please read the guidelines below then visit the Journal's submission site <https://mc.manuscriptcentral.com/jba> to upload your manuscript. Please note that manuscripts not conforming to these guidelines may be returned.

Only manuscripts of sufficient quality that meet the aims and scope of *Journal of Biomaterials Applications* will be reviewed.

There are no fees payable to submit or publish in this journal.

As part of the submission process you will be required to warrant that you are submitting your original work, that you have the rights in the work, that you are submitting the work for first publication in the Journal and that it is not being considered for publication elsewhere and has not already been published elsewhere, and that you have obtained and can supply all necessary permissions for the reproduction of any copyright works not owned by you.

1. [What do we publish?](#)
 - 1.1 [Aims & Scope](#)
 - 1.2 [Article types](#)
 - 1.3 [Writing your paper](#)
2. [Editorial policies](#)
 - 2.1 [Peer review policy](#)
 - 2.2 [Authorship](#)
 - 2.3 [Acknowledgements](#)
 - 2.4 [Funding](#)
 - 2.5 [Declaration of conflicting interests](#)
 - 2.6 [Research ethics and patient consent](#)
 - 2.7 [Research Data](#)
3. [Publishing policies](#)
 - 3.1 [Publication ethics](#)
 - 3.2 [Contributor's publishing agreement](#)
 - 3.3 [Open access and author archiving](#)
4. [Preparing your manuscript](#)
 - 4.1 [Formatting](#)
 - 4.2 [Artwork, figures and other graphics](#)
 - 4.3 [Supplementary material](#)
 - 4.4 [Reference style](#)
 - 4.5 [English language editing services](#)
5. [Submitting your manuscript](#)
 - 5.1 [ORCID](#)
 - 5.2 [Information required for completing your submission](#)
 - 5.3 [Permissions](#)
6. [On acceptance and publication](#)
 - 6.1 [SAGE Production](#)
 - 6.2 [Online First publication](#)
 - 6.3 [Access to your published article](#)
 - 6.4 [Promoting your article](#)
7. [Further information](#)

1. What do we publish?

1.1 Aims & Scope

Before submitting your manuscript to *Journal of Biomaterials Applications*, please ensure you have read the [Aims & Scope](#).

1.2 Article Types

Journal of Biomaterials Applications publishes original research and review articles that emphasize the development, manufacture and clinical applications of biomaterials. The Journal considers the following kinds of article for publication:

Peer-reviewed articles by biomedical specialists from around the world cover:

- New developments in biomaterials
- R&D, properties and performance, evaluation and applications
- Applications in biomedical materials and devices - from sutures and wound dressings to biosensors and cardiovascular devices
- Current findings in biological compatibility/incompatibility of biomaterials

Please note: We do occasionally publish papers on dental materials, but these are usually materials that have wider applicability as implant materials. If your work is on materials specifically for dentistry, please consider alternative journals.

1.3 Writing your paper

The SAGE Author Gateway has some general advice and on [how to get published](#), plus links to further resources.

1.3.1 Make your article discoverable

When writing up your paper, think about how you can make it discoverable. The title, keywords and abstract are key to ensuring readers find your article through search engines such as Google. For information and guidance on how best to title your article, write your abstract and select your keywords, have a look at this page on the Gateway: [How to Help Readers Find Your Article Online](#).

[Back to top](#)

2. Editorial policies

2.1 Peer review policy

Journal of Biomaterials Applications adheres to a rigorous double-anonymize reviewing policy in which the identity of both the reviewer and author are always concealed from both parties.

All manuscripts are reviewed initially by the Editors and only those papers that meet the scientific and editorial standards of the journal, and fit within the aims and scope of the journal, will be sent for outside review.

Peer Review Process: We endeavour to obtain at least 2 referee's reports. All manuscripts are reviewed as rapidly as possible, and an editorial decision is generally reached within 4-6 weeks of submission

As part of the submission process you will be asked to provide the names of 2 peers who could be called upon to review your manuscript. Recommended reviewers should be experts in their fields and should be able to provide an objective assessment of the manuscript. Please be aware of any conflicts of interest when recommending reviewers. Examples of conflicts of interest include (but are not limited to) the below:

- The reviewer should have no prior knowledge of your submission
- The reviewer should not have recently collaborated with any of the authors
- Reviewer nominees from the same institution as any of the authors are not permitted

Please note that the Editors are not obliged to invite any recommended/opposed reviewers to assess your manuscript.

Journal of Biomaterials Applications is committed to delivering high quality, fast peer-review for your paper, and as such has partnered with Publons. Publons is a third party service that seeks to track, verify and give

credit for peer review. Reviewers for the journal can opt in to Publons in order to claim their reviews or have them automatically verified and added to their reviewer profile. Reviewers claiming credit for their review will be associated with the relevant journal, but the article name, reviewer's decision and the content of their review is not published on the site. For more information visit the [Publons](#) website.

2.2 Authorship

Papers should only be submitted for consideration once consent is given by all contributing authors. Those submitting papers should carefully check that all those whose work contributed to the paper are acknowledged as contributing authors.

The list of authors should include all those who can legitimately claim authorship. This is all those who:

1. Made a substantial contribution to the concept or design of the work; or acquisition, analysis or interpretation of data,
2. Drafted the article or revised it critically for important intellectual content,
3. Approved the version to be published,
4. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content.

Authors should meet the conditions of all of the points above. When a large, multicentre group has conducted the work, the group should identify the individuals who accept direct responsibility for the manuscript. These individuals should fully meet the criteria for authorship.

Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group alone does not constitute authorship, although all contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in the Acknowledgments section. Please refer to the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) authorship guidelines](#) for more information on authorship.

2.3 Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an Acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, or a department chair who provided only general support.

Please supply any personal acknowledgements separately to the main text to facilitate anonymous peer review.

2.3.1 Third party submissions

Where an individual who is not listed as an author submits a manuscript on behalf of the author(s), a statement must be included in the Acknowledgements section of the manuscript and in the accompanying cover letter. The statements must:

- Disclose this type of editorial assistance – including the individual's name, company and level of input
- Identify any entities that paid for this assistance
- Confirm that the listed authors have authorized the submission of their manuscript via third party and approved any statements or declarations, e.g. conflicting interests, funding, etc.

Where appropriate, SAGE reserves the right to deny consideration to manuscripts submitted by a third party rather than by the authors themselves.

2.3.2 Writing assistance

Individuals who provided writing assistance, e.g. from a specialist communications company, do not qualify as authors and so should be included in the Acknowledgements section. Authors must disclose any writing assistance – including the individual's name, company and level of input – and identify the entity that paid for this assistance. It is not necessary to disclose use of language polishing services.

2.4 Funding

Journal of Biomaterials Applications requires all authors to acknowledge their funding in a consistent fashion under a separate heading. Please visit the [Funding Acknowledgements](#) page on the SAGE Journal Author Gateway to confirm the format of the acknowledgment text in the event of funding, or state that: This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

2.5 Declaration of conflicting interests

It is the policy of *Journal of Biomaterials Applications* to require a declaration of conflicting interests from all authors enabling a statement to be carried within the paginated pages of all published articles.

Please ensure that a 'Declaration of Conflicting Interests' statement is included at the end of your manuscript, after any acknowledgements and prior to the references. If no conflict exists, please state that 'The Author(s) declare(s) that there is no conflict of interest'. For guidance on conflict of interest statements, please see the ICMJE recommendations [here](#).

2.6 Research ethics and patient consent

Medical research involving human subjects must be conducted according to the [World Medical Association Declaration of Helsinki](#).

Submitted manuscripts should conform to the [ICMJE Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#), and all papers reporting animal and/or human studies must state in the methods section that the relevant Ethics Committee or Institutional Review Board provided (or waived) approval. Please ensure that you have provided the full name and institution of the review committee, in addition to the approval number.

For research articles, authors are also required to state in the methods section whether participants provided informed consent and whether the consent was written or verbal.

Information on informed consent to report individual cases or case series should be included in the manuscript text. A statement is required regarding whether written informed consent for patient information and images to be published was provided by the patient(s) or a legally authorized representative.

Please also refer to the [ICMJE Recommendations for the Protection of Research Participants](#).

All research involving animals submitted for publication must be approved by an ethics committee with oversight of the facility in which the studies were conducted. The Journal has adopted the [ARRIVE](#) guidelines.

2.7 Research Data

The journal is committed to facilitating openness, transparency and reproducibility of research, and has the following research data sharing policy. For more information, including FAQs please visit the [SAGE Research Data policy pages](#).

Subject to appropriate ethical and legal considerations, authors are encouraged to:

- share your research data in a relevant public data repository
- include a data availability statement linking to your data. If it is not possible to share your data, we encourage you to consider using the statement to explain why it cannot be shared.
- cite this data in your research

[Back to top](#)

3. Publishing Policies

3.1 Publication ethics

SAGE is committed to upholding the integrity of the academic record. We encourage authors to refer to the Committee on Publication Ethics' [International Standards for Authors](#) and view the Publication Ethics page on the [SAGE Author Gateway](#).

3.1.1 Plagiarism

Journal of Biomaterials Applications and SAGE take issues of copyright infringement, plagiarism or other breaches of best practice in publication very seriously. We seek to protect the rights of our authors and we always investigate claims of plagiarism or misuse of published articles. Equally, we seek to protect the reputation of the journal against malpractice. Submitted articles may be checked with duplication-checking software. Where an article, for example, is found to have plagiarised other work or included third-party copyright material without permission or with insufficient acknowledgement, or where the authorship of the article is contested, we reserve the right to take action including, but not limited to: publishing an erratum or corrigendum (correction); retracting the article; taking up the matter with the head of department or dean of the author's institution and/or relevant academic bodies or societies; or taking appropriate legal action.

3.1.2 Prior publication

If material has been previously published it is not generally acceptable for publication in a SAGE journal. However, there are certain circumstances where previously published material can be considered for publication. Please refer to the guidance on the [SAGE Author Gateway](#) or if in doubt, contact the Editor at the address given below.

3.2 Contributor's publishing agreement

Before publication, SAGE requires the author as the rights holder to sign a Journal Contributor's Publishing Agreement. SAGE's Journal Contributor's Publishing Agreement is an exclusive licence agreement which means that the author retains copyright in the work but grants SAGE the sole and exclusive right and licence to publish for the full legal term of copyright. Exceptions may exist where an assignment of copyright is required or preferred by a proprietor other than SAGE. In this case copyright in the work will be assigned from the author to the society. For more information please visit the [SAGE Author Gateway](#).

3.3 Open access and author archiving

Journal of Biomaterials Applications offers optional open access publishing via the SAGE Choice programme. For more information on Open Access publishing options at SAGE please visit [SAGE Open Access](#). For information on funding body compliance, and depositing your article in repositories, please visit [SAGE's Author Archiving and Re-Use Guidelines](#) and [Publishing Policies](#).

[Back to top](#)

4. Preparing your manuscript for submission

4.1 Formatting

The preferred format for your manuscript is Word. LaTeX files are also accepted. Word and (La)Tex templates are available on the [Manuscript Submission Guidelines](#) page of our Author Gateway.

4.2 Artwork, figures and other graphics

For guidance on the preparation of illustrations, pictures and graphs in electronic format, please visit SAGE's [Manuscript Submission Guidelines](#).

Figures supplied in colour will appear in colour online regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For specifically requested colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from SAGE after receipt of your accepted article.

4.3 Supplementary material

This journal is able to host additional materials online (e.g. datasets, podcasts, videos, images etc) alongside the full-text of the article. For more information please refer to our [guidelines on submitting supplementary files](#).

4.4 Reference style

Journal of Biomaterials Applications adheres to the [SAGE Vancouver](#) reference style. View the [SAGE Vancouver](#) guidelines to ensure your manuscript conforms to this reference style.

If you use [EndNote](#) to manage references, you can download the [SAGE Vancouver EndNote output file](#).

4.5 English language editing services

Authors seeking assistance with English language editing, translation, or figure and manuscript formatting to fit the journal's specifications should consider using SAGE Language Services. Visit [SAGE Language Services](#) on our Journal Author Gateway for further information.

[Back to top](#)

5. Submitting your manuscript

Journal of Biomaterials Applications is hosted on SAGE Track, a web based online submission and peer review system powered by ScholarOne™ Manuscripts. Visit <https://mc.manuscriptcentral.com/jba> to login and submit your article online.

IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the past year it is likely that you will have had an account created. For further guidance on submitting your manuscript online please visit ScholarOne [Online Help](#).

5.1 ORCID

As part of our commitment to ensuring an ethical, transparent and fair peer review process SAGE is a supporting member of [ORCID, the Open Researcher and Contributor ID](#). ORCID provides a unique and persistent digital identifier that distinguishes researchers from every other researcher, even those who share the same name, and, through integration in key research workflows such as manuscript and grant submission, supports automated linkages between researchers and their professional activities, ensuring that their work is recognized.

The collection of ORCID iDs from corresponding authors is now part of the submission process of this journal. If you already have an ORCID iD you will be asked to associate that to your submission during the online submission process. We also strongly encourage all co-authors to link their ORCID ID to their accounts in our online peer review platforms. It takes seconds to do: click the link when prompted, sign into your ORCID account and our systems are automatically updated. Your ORCID iD will become part of your accepted publication's metadata, making your work attributable to you and only you. Your ORCID iD is published with your article so that fellow researchers reading your work can link to your ORCID profile and from there link to your other publications.

If you do not already have an ORCID iD please follow this [link](#) to create one or visit our [ORCID homepage](#) to learn more.

5.2 Information required for completing your submission

You will be asked to provide contact details and academic affiliations for all co-authors via the submission system and identify who is to be the corresponding author. These details must match what appears on your manuscript. At this stage please ensure you have included all the required statements and declarations and uploaded any additional supplementary files (including reporting guidelines where relevant).

5.3 Permissions

Please also ensure that you have obtained any necessary permission from copyright holders for reproducing any illustrations, tables, figures or lengthy quotations previously published elsewhere. For further information including guidance on fair dealing for criticism and review, please see the Copyright and Permissions page on the [SAGE Author Gateway](#).

[Back to top](#)

6. On acceptance and publication

6.1 SAGE Production

Your SAGE Production Editor will keep you informed as to your article's progress throughout the production process. Proofs will be sent by PDF to the corresponding author and should be returned promptly. Authors

are reminded to check their proofs carefully to confirm that all author information, including names, affiliations, sequence and contact details are correct, and that Funding and Conflict of Interest statements, if any, are accurate. Please note that if there are any changes to the author list at this stage all authors will be required to complete and sign a form authorising the change.

6.2 Online First publication

Online First allows final articles (completed and approved articles awaiting assignment to a future issue) to be published online prior to their inclusion in a journal issue, which significantly reduces the lead time between submission and publication. Visit the [SAGE Journals help page](#) for more details, including how to cite Online First articles.

6.3 Access to your published article

SAGE provides authors with online access to their final article.

6.4 Promoting your article

Publication is not the end of the process! You can help disseminate your paper and ensure it is as widely read and cited as possible. The SAGE Author Gateway has numerous resources to help you promote your work. Visit the [Promote Your Article](#) page on the Gateway for tips and advice.

[Back to top](#)

7. Further information

Any correspondence, queries or additional requests for information on the manuscript submission process should be sent to the *Journal of Biomaterials Applications* editorial office as follows:

Jonathan Knowles, at the following email address: j.knowles@ucl.ac.uk

ANEXO C: APROVAÇÃO DO CEUA

24/03/2023, 22:36

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica**Parecer Final**

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "MORFOLOGIA, MORFOMETRIA E HISTOLOGIA DE FERIDAS TRATADAS COM BIOPOLIMÉRICO DE QUITOSANA/XANTANA/B-GLICANA E PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 6115 e tendo como participante(s) VALTER DIAS DA SILVA (discente), PAMELLA GODINHO GUTIERRES (discente), MÁRCIA ZILJOLI BELLINI (participante externo), CECILIA LAPOSY SANTAREM (docente), ELISANGELA OLEGÁRIO DA SILVA (docente), ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (orientador responsável), foi avaliado e APR. COM RECOMENDAÇÃO 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 APR. COM RECOMENDAÇÃO em reunião realizada em 06/05/2020.

Vigência do projeto: 05/2020 a 10/2022.

ANIMAL VIVO

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Coelho (Nova Zelândia)	22	4 quilos	1 anos	M	Biotério
Coelho (Nova Zelândia)	22	4 quilos	1 anos	F	Biotério

Presidente Prudente, 18 de Novembro de 2020.

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

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

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação – CPDI – 18 3229-2079 – cpdi@unoeste.br
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP – 18 3229-2079 – cep@unoeste.br
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – 183229-2079 – ceua@unoeste.br

valide este documento em www.unoeste.br/sgp/certificados informando o código de segurança 4840281141b5f76b30a85e1b0a3cc098

ANEXO D: ESTILO DE REFERÊNCIA SAGE VANCOUVER

6.2 SAGE Vancouver

1. General

1. Reference numbers have full points in the reference list.
2. Please ensure that publications are referenced in the order in which they appear in the text.
3. Journal titles should be abbreviated according to the standard in the Index Medicus. If unsure, please check for any inconsistencies within reference lists. For STM journals, please refer also to the following: <http://scieng.library.ubc.ca/coden/>.
4. Do not separate initials with spaces or full points, but add a full point after last initial before the title.
5. Up to three authors may be listed. If more, then list the first three authors and represent the rest by et al. Fewer author names followed by et al. is also acceptable. Where et al. is used, it should always be upright, not italic in both references and textual citations.
6. Last Names containing de, van, von, De, Van, Von, de la, etc. should be listed under D and V respectively. List them as: De Roux DP and not Roux DP, de. When cited in the main text without the first name, use capitals for De, Van, Von, De la, etc. (Van Dijk, year)
7. Names containing Jr or II should be listed as follows:
 - Author Last Name Initial Jr (year)
 - Author Last Name Initial II (year)

2. Text citations

Please use superscript numerals *after* the punctuation (STM) or numbers in square brackets (HSS), and check that it corresponds to the correct number in the reference list.

3. Reference styles

Book

1. Huff D. *How to lie with statistics*. 4th ed. London: Penguin, 1991, p.51.

Chapter in book

1. Huff D and Black TL. Comprehensive statistics. In: Miller C and Smith H (eds) *How to lie with statistics*. 4th ed. London: Penguin, 1991, pp.51–55.

Journal article

1. Ludbrook J, Miller T and Russel A. Musculoavenous pumps in the human lower limb. *Am Heart J* 1966; 71: 635–641.
2. Araki C, Black TL, Patberg FT, et al. Significance of calf muscle pump function in venous ulceration. *J Vasc Surg* 1994; 20: 872–879.

Journal article published ahead of print

1. Ludbrook J. Musculoavenous pumps in the human lower limb. *Am Heart J*. Epub ahead of print 12 June 2011. DOI: 10.1177/095443271167940.

Website

1. Smith JR. Choosing your reference style. *Online Referencing* 2(3), <http://orj.sagepub.com> (2003, accessed 12 October 2008).
2. National Center for Professional Certification. Factors affecting organizational climate and retention, www.cwla.org./programmes/triechmann/2002fbwfiles (2002, accessed 10 July 2010).

Conference paper

1. Peters J. Musculovenous pumps in the human lower limb. In: *ASME conference on automatic transmissions* (ed A O'Brien), Pisa, Italy, 29 May–2 June 2003, paper no. GE1234, pp.4–10. New York: ASME.

Thesis/dissertation

1. Clark JM. *Referencing style for journals*. PhD Thesis, University of Leicester, UK, 2002.

Patent and patent applications

1. Smith ST. *Referencing styles for journals – a new method*. Patent 12346-ZH, USA, 2011.

2.

3. Jones P. *Referencing styles for journals – a new method*. Patent application 12346-ZHA, USA, 2011.

Report (published/unpublished)

1. MacDonald S. The state of social welfare in the UK. Report, University of Durham, UK, June 2011.

2. Citigroup Ltd. *How to make your money work for you*. Report for the Department of Finance. Report no. 123345, 13 June 2011. Oxford: OUP.

SAE/JSAE etc. papers

1. Clark JM. A new exhaust gasket manifold for powertrains. SAE paper 2002-0101234, 2002.

Newspaper/magazine

1. Clark JM. *Referencing style for journals*. *The Independent*, 21 May 2006, p.10.

Package insert (medical etc.)

1. Eisai Inc. Aloxi (package insert). New York: Esai Inc, 2008.

Manual (automotive etc.)

1. Fiat. Driver's manual, Fiat Uno 4-litre diesel model, December 2010.

Standard

1. ISO 27799:2008. Information security management in health.

Tip!

See various sites for more information on Vancouver and journal abbreviations:

<http://www.library.uwa.edu.au/students/guides>

<http://www2.le.ac.uk/library/help/citing/managinginformation>

<http://scieng.library.ubc.ca/coden/>

http://www.wsulibs.wsu.edu/general/journal_abbreviations.html