



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

**DIEGO OSVALDO DOS SANTOS**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E DIMENSÃO FRACTAL NA  
AVALIAÇÃO DE COLÁGENO EM FERIDAS TRATADAS COM PLASMA RICO EM  
PLAQUETAS AUTÓLOGO NA FORMA LÍQUIDA E GEL EM COELHOS**

Presidente Prudente - SP  
2024



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

**DIEGO OSVALDO DOS SANTOS**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E DIMENSÃO FRACTAL NA  
AVALIAÇÃO DE COLÁGENO EM FERIDAS TRATADAS COM PLASMA RICO EM  
PLAQUETAS AUTÓLOGO NA FORMA LÍQUIDA E GEL EM COELHOS**

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

Orientador (a):  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosa Maria Barilli Nogueira

Presidente Prudente - SP  
2024

636.089  
S237a

Santos, Diego Osvaldo dos.

Análise morfológica, morfométrica e dimensão fractal na avaliação de colágeno em feridas tratadas com plasma rico em plaquetas autólogo na forma líquida e gel em coelhos / Diego Osvaldo dos Santos – Presidente Prudente, 2024.

46f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2024.

Bibliografia.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosa Maria Barilli Nogueira

1. Colágeno. 2. Dimensão fractal. 3. Cicatrização.  
4. Plasma Rico em Plaquetas. 5. Coelhos I. Título.

**DIEGO OSVALDO DOS SANTOS**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E DIMENSÃO FRACTAL NA  
AVALIAÇÃO DE COLÁGENO EM FERIDAS TRATADAS COM PLASMA RICO EM  
PLAQUETAS AUTÓLOGO NA FORMA LÍQUIDA E GEL EM COELHOS**

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

Presidente Prudente, 04 de março de 2024.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosa Maria Barilli Nogueira  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cecília Laposy Santarém  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Prof. Dr. Valter Dias da Silva  
Centro Universitário de Adamantina – UniFAI  
Adamantina-SP

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por estar essencialmente presente em minha vida, meu amparo. Dedico em especial a minha mãe, Sílvia Aparecida dos Santos, e irmã, Stephanie Gabrieli dos Santos, que estiveram me dando todo o apoio quando precisei, aqueles que contribuíram diretamente e indiretamente para a realização deste projeto.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Ele, que se manteve presente em todos os momentos da minha vida, me dando amparo e dando forças para continuar, meu verdadeiro amigo, Deus.

Agradeço em segundo lugar a minha família, que se manteve firme para que esse sonho se concretizasse, e também, a todos os amigos e a família que formamos nessa jornada, que se mantiveram ao meu lado nos momentos felizes e nos mais difíceis.

A orientadora desse projeto, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Maria Barilli Nogueira, por toda diligência para a realização desta proposta, o meu agradecimento mais sincero.

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

*“Faça o teu melhor, na condição que  
você tem, enquanto você não tem  
condições, para fazer melhor ainda”.*

*(Mário Sérgio Cortella)*

## RESUMO

### **Análise morfológica, morfométrica e dimensão fractal na avaliação de colágeno em feridas tratadas com plasma rico em plaquetas autólogo na forma líquida e gel em coelhos**

Colágeno é o principal elemento responsável por garantir a resistência estrutural do tecido cutâneo, com predomínio do colágeno tipo III comparado ao tipo I, no processo cicatricial. O processo de regeneração na pele pode ser resultado de diversos fatores que implicam na interrupção da continuidade de um tecido corporal. O objetivo deste estudo foi avaliar por meio da dimensão fractal, de forma quali-quantitativa os colágenos tipos I e tipo III, e os aspectos morfológicos e morfométricos de feridas dérmicas tratadas com plasma rico em plaquetas autólogo (PRPa) líquido e gel. Um total de 18 animais foram distribuídos em três grupos, controle, PRPa gel e PRPa líquido com seis animais cada. Aspectos macroscópicos e morfométricos não diferiram significativamente entre os grupos, as feridas permaneceram róseas durante todos os momentos, com ausência de áreas necróticas, exsudato e edema, sugerindo a ausência de sinais de infecção bacteriana. Nos grupos GPRPaL e GPRPaG as fibras colágenas do tipo I, foram melhor distinguidas quando comparadas às fibras colágenas do tipo III, que estavam distribuídas de forma irregular. Conclui-se que tanto na avaliação da percentagem de contração, como na análise de dimensão fractal, os métodos utilizados demonstraram-se eficazes para caracterizar a evolução da cicatrização de feridas dérmicas; todos os tratamentos foram eficazes e contribuíram com a reparação tecidual que ocorreu sem nenhum sinal de complicação secundária; No final da avaliação o GPRPaG e o GPRPaL apresentaram uma diminuição na dimensão fractal, respaldando a ideia de que o uso de PRP propicia uma organização mais regular e menos complexa das fibras colágenas. Isso implica em uma disposição mais uniforme, com reduzida variação em termos de direção e densidade das fibras.

**Palavras-chave:** colagenização, análise fractal, cicatrização, biomaterial, modelo animal

## **ABSTRACT**

### **Morphological, morphometric and fractal dimension analysis of collagen in wounds treated with autologous platelet rich plasma in liquid and gel form in rabbits**

Collagen is the main element responsible for ensuring the structural strength of skin tissue, with type III collagen predominating compared to type I in the healing process. The regeneration process in the skin can be the result of various factors that imply an interruption in the continuity of body tissue. The aim of this study was to evaluate type I and type III collagens and the morphological and morphometric aspects of dermal wounds treated with liquid and gel autologous platelet-rich plasma (PRPa) using the fractal dimension. A total of 18 animals were divided into three groups, control, PRPa gel and PRPa liquid with six animals each. Macroscopic and morphometric aspects did not differ significantly between the groups. The wounds remained pink at all times, with no necrotic areas, exudate or edema, suggesting no signs of bacterial infection. In the GPRPaL and GPRPaG groups, type I collagen fibers were better distinguished compared to type III collagen fibers, which were irregularly distributed. It can be concluded that both in the assessment of the percentage of contraction and in the analysis of the fractal dimension, the methods used proved to be effective in characterizing the evolution of dermal wound healing; all the treatments were effective and contributed to tissue repair, which occurred without any sign of secondary complication; at the end of the assessment, GPRPaG and GPRPaL showed a decrease in the fractal dimension, supporting the idea that the use of PRP provides a more regular and less complex organization of the collagen fibres. This implies a more uniform arrangement, with reduced variation in terms of fiber direction and density.

**Keywords:** collagenization, fractal analysis, healing, biomaterial, animal model

## LISTA DE SIGLAS

%	– Percentagem
$A_f$	– Área Final
$A_i$	– Área Inicial
AI	– Área Original
AM	– Área Mensurada
CEUA	– Comissão de Ética no Uso de Animais
COL 1	– Colágeno tipo 1
COL 3	– Colágeno tipo 3
DF	– Dimensão Fractal
EGF	– Fator de Crescimento Epidérmico
F1	– Ferida 1
F2	– Ferida 2
F3	– Ferida 3
F4	– Ferida 4
g	– Gramas
G	– Gravidades
GC	– Grupo Controle
GPRPa	– Grupo PRPa
GPRPaG	– Grupo PRPa gel
GPRPaL	– Grupo PRPa líquido
H	– Horas
H/E	– Hematoxilina-Eosina
IGF	– Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IM	– Intramuscular
Kg	– Quilograma
M0	– Momento 0 - Dia da indução da ferida
M7	– Momento 7 - 7º dia de cicatrização
M14	– Momento 14 - 14º dia de cicatrização

M21	– Momento 21 - 21º dia de cicatrização
M28	– Momento 28 - 28º dia de cicatrização
MEC	– Matriz Extracelular
mg	– Miligrama
mL	– Mililitro
mm	– Milímetro
mm <sup>2</sup>	– Milímetro quadrado
NIH	– Instituto Nacional em Saúde
PAFR	– Percentual da Área Remanescente da Ferida
PC	– Percentagem de Contração
PDGF	– Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PPP	– Plasma Pobre em Plaquetas
PRP	– Plasma Rico em Plaquetas
PRPa	– Plasma Rico em Plaquetas Autólogo
RGB	– Red, Green, Blue
SC	– Subcutânea
SBCAL	– Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SC	– Subcutâneo
ST	– Sangue Total
TGF-β	– Fator de Crescimento Transformador β
UNOESTE	– Universidade do Oeste Paulista
µm	– Micrômetros

## SUMÁRIO

<b>ARTIGO CIENTÍFICO: Análise Morfológica, Morfométrica e Dimensão Fractal na Avaliação de Colágeno em Feridas Tratadas com Plasma Rico em Plaquetas Autólogo na Forma Líquida e Gel em Coelhos.....</b>	<b>13</b>
<b>ANEXO A - APROVAÇÃO ÉTICA.....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO B - NORMAS DA REVISTA.....</b>	<b>40</b>

**ARTIGO CIENTÍFICO****ANÁLISE MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E DIMENSÃO FRACTAL NA AVALIAÇÃO DE COLÁGENO EM FERIDAS TRATADAS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO NA FORMA LÍQUIDA E GEL EM COELHOS****MORPHOLOGICAL, MORPHOMETRIC AND FRACTAL DIMENSION ANALYSIS OF COLLAGEN IN WOUNDS TREATED WITH AUTOLOGOUS PLATELET RICH PLASMA IN LIQUID AND GEL FORM IN RABBITS**

Diego Osvaldo dos Santos<sup>1</sup>, Nadiele Taise Massaranduba<sup>1</sup>, Valter Dias da Silva<sup>1</sup>, Thaoan Bruno Mariano<sup>1</sup>, Cecília Laposy Santarém<sup>1</sup>, Rosa Maria Barilli Nogueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE - Presidente Prudente, SP, Brasil

**Autor para Correspondência:** Rosa Maria Barilli Nogueira, Programa Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Rodovia Raposo Tavares, km 572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente - SP, Brasil, CEP: 19067-175, Telefone: (18) 3229-2000, E-mail: rosa@unoeste.br

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: Anais da Academia Brasileira de Ciências, Fator de impacto: 1.81, Classificação Qualis: A2

**ANÁLISE MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E DIMENSÃO FRACTAL NA  
AVALIAÇÃO DE COLÁGENO EM FERIDAS TRATADAS COM PLASMA RICO  
EM PLAQUETAS AUTÓLOGO NA FORMA LÍQUIDA E GEL EM COELHOS**

**Diego Osvaldo dos Santos<sup>1\*</sup>**

<https://orcid.org/0000-0003-4383-0488>

**Nadiele Taise Massaranduba<sup>1</sup>**

<http://orcid.org/0000-0002-5953-2023>

**Valter Dias da Silva<sup>1</sup>**

<https://orcid.org/0009-0006-2958-9594>

**Thaoan Bruno Mariano<sup>1</sup>**

<http://orcid.org/0000-0001-5729-0932>

**Cecília Laposy Santarém<sup>2</sup>**

<https://orcid.org/0000-0002-4775-6142>

**Rosa Maria Barilli Nogueira<sup>2</sup>**

<https://orcid.org/0000-0002-1835-7812>

<sup>1</sup> Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Rodovia Raposo Tavares, km 572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente - São Paulo, Brasil, CEP:19067-175

<sup>2</sup> Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Rodovia Raposo Tavares, km 572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente - São Paulo, Brasil, CEP:19067-175

Key-words: **collagenization, fractal analysis, healing, biomaterial, animal model**

Running Title: **Fractal Dimension of Platelet Rich Plasma Collagen**

Seção da AABC: **Ciência Animal**

Correspondence to: **Diego Osvaldo dos Santos**

E-mail: [diegoosantos@outlook.com](mailto:diegoosantos@outlook.com)

Telefone: (12) 99758-2459

R. José Bongiovani, 700 - Cidade Universitária, Pres. Prudente - São Paulo, Brasil,  
CEP: 19050-920

## ABSTRACT

Collagen is the main element responsible for ensuring the structural resistance of the cutaneous tissue, with a predominance of type III collagen compared to type I. The scarring process in the skin can result from various factors that characterize the interruption of the continuity of a body tissue. The objective of this study was to evaluate, through fractal dimension, the qualitative and quantitative aspects of type I and type III collagens, as well as the morphological and morphometric aspects of dermal wounds treated with autologous platelet-rich plasma (PRP) in liquid and gel forms. A total of 18 animals were divided into three groups: control, PRP gel, and PRP liquid, with six animals each. Macroscopic and morphometric aspects did not differ significantly among the groups; the wounds remained pink throughout all time points, with the absence of necrotic areas, exudate, and edema, indicating the absence of signs of bacterial infection. In the PRP liquid and PRP gel groups, type I collagen fibers were better distinguished when compared to type III collagen fibers, which were irregularly distributed. It is concluded that, both in the evaluation of the percentage of contraction and in the fractal dimension analysis, the methods used proved to be effective in characterizing the evolution of dermal wound healing; all treatments were effective and contributed to tissue repair without any signs of secondary complications. The PRP gel and PRP liquid groups showed a decrease in fractal dimension, supporting the idea that the use of PRP promotes a more regular and less complex organization of collagen fibers. This implies a more uniform arrangement, with reduced variation in terms of direction and density of the fibers.

## INTRODUÇÃO

A pele é descrita como o maior órgão do corpo humano, desempenhando importante função de revestimento do organismo, garantindo a proteção contra diferentes agentes agressores externos como corpos estranhos, microorganismos, radiação, atritos, poluição, traumas dentre outros (Humphrey *et al.* 2021). Constituída por duas camadas justapostas: a derme, formada por vasos sanguíneos, terminações nervosas, fibras colágenas, fibras musculares, fibras elásticas e glicosaminaproteoglicanas e a epiderme, composta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. Nas duas camadas são encontradas células

diferenciadas e entre elas destacam-se os queratinócitos, encontrados na epiderme, e os fibroblastos e macrófagos, encontrados na derme (Hsu & Fuchs 2022).

O colágeno, principal componente da derme, é responsável pela resistência estrutural do tecido cutâneo onde, primariamente, a matriz dérmica é composta por dois tipos de colágenos principais: tipo I, localizado principalmente na região reticular, a camada mais profunda da pele, constituída de tecido conjuntivo denso não modelado, e o tipo III, presente em grande parte na região papilar, região mais superficial, constituída por tecido conjuntivo frouxo, correspondendo a 80-85%, e 15-20%, do total dessa glicoproteína respectivamente. Embora as feridas revelem uma proporção desigual em relação à integridade dérmica, há uma predominância de colágeno do tipo III (Gao *et al.* 2022).

As feridas cutâneas podem ser resultado de diferentes fatores que caracterizam a interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, afetando sua fisiologia e estrutura dérmica. O processo de cicatrização se divide em três fases distintas: fase inflamatória, com presença de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos, e além de vários mediadores químicos; fase proliferativa, onde ocorre uma reconstituição epidérmica, devido a proliferação de fibroblastos na região papilar da derme, modulada aparentemente pelos macrófagos; e a fase de maturação ou remodelamento tecidual, diminuindo a atividade celular e a concentração de vasos sanguíneos (Junqueira & Carneiro 2014).

O processo de cicatrização envolve células sanguíneas, mediado principalmente por plaquetas que desempenhando papel importante na hemostasia, matriz extracelular (MEC), mediadores celulares e células parenquimatosas, podendo estar associadas com diversos fatores, que acabam prejudicando esse processo, tais como a desnutrição, drogas, radiação e hipóxia (Bernatchez & Bichel J 2023).

Nos últimos anos, tem havido um notável avanço no desenvolvimento de bioativos e biomateriais que desempenham um papel crucial na regulação da atividade inflamatória e na

promoção da reparação tecidual. Esse progresso é particularmente evidente nas áreas de engenharia tecidual e medicina regenerativa, onde a busca por soluções inovadoras para tratar lesões e doenças tem sido incessante. Os bioativos e biomateriais desenvolvidos são projetados não apenas para fornecer suporte estrutural aos tecidos danificados, mas também para modular as respostas inflamatórias do corpo, promovendo assim uma regeneração mais eficaz e rápida. Esse crescimento contínuo no campo dos bioativos destaca o potencial significativo dessas tecnologias para revolucionar os cuidados de saúde, oferecendo novas abordagens terapêuticas para uma variedade de condições médicas (Garcia-Orue *et al.* 2022).

O uso do plasma rico em plaquetas (PRP), seja de origem autóloga, homóloga ou heteróloga é visto como um avanço para a dermatologia e cirurgia plástica, por garantir um processo minimamente invasivo e de baixo custo, com enfoque na remodelação cicatricial por mediadores biológicos, garantindo uma vantagem pela elevada concentração de fatores de crescimento, como o Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); Fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ); Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF); e o Fator de crescimento epidérmico (EGF), e citocinas, favorecendo uma homogeneidade, com melhor distribuição de colágenos, integrinas e vitamina A, além de proteínas bioativas (White *et al.* 2021).

Essas constatações clínicas são respaldadas por uma série de estudos que destacam a diversidade de benefícios proporcionados pelo PRP além do seu efeito direto nos tecidos. As evidências acumuladas revelam não apenas a eficácia na regeneração tecidual, mas também seu impacto positivo na saúde psicológica dos pacientes. Estudos têm demonstrado consistentemente que a aplicação do PRP não só contribui para o fortalecimento da autoestima, mas também está associada a uma melhoria significativa na percepção individual da própria beleza. Além disso, a capacidade do PRP de modular a resposta inflamatória tem sido destacada como um fator chave na minimização de complicações pós-procedimentos

estéticos, promovendo uma recuperação mais rápida e resultados estéticos superiores. Essas descobertas respaldam firmemente o uso do PRP não apenas como uma ferramenta terapêutica, mas também como um componente integral na promoção do bem-estar físico, emocional e estético (Buzalaf & Levy 2022).

A precisão de análises das lesões teciduais de lâminas histológicas tem sido realizada com o uso de ferramentas digitais como a dimensão fractal, método considerado objetivo e repetível, permitindo identificar e avaliar em um objeto suas características irregulares e de grande complexidade, em diferentes escalas dimensionais, sem interferência do avaliador (Ustaoğlu *et al.* 2020).

Este estudo propõe a hipótese de que podem existir variações no processo de cicatrização e na síntese de colágeno ao utilizar o PRP nas formas líquida (para injeção) e gel (tópica). Além disso, sugere que a análise da dimensão fractal possa ser um método eficaz para avaliar os diferentes tipos de colágeno, uma proteína crucial no processo de cicatrização e reparo de lesões dermo-epidérmicas.

Desta forma, o objetivo deste estudo, foi avaliar a eficácia de PRPa líquido e gel, com potencial utilização na regeneração de lesões da pele em feridas experimentalmente induzidas em coelhos, avaliando de forma quali-quantitativa os colágenos tipos I e tipo III, através do método da análise morfológica, morfométrica e dimensão fractal.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Princípios Éticos da Pesquisa**

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil, com animais provenientes, como subgrupo, do projeto com protocolo nº 6157, estando de acordo com as normas e princípios éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em

Animais de Laboratório (SBCAL) e do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo *National Research Council*.

### **Modelo Animal**

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados 18 coelhos, machos adultos, da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), pesando em média 3,5 kg, mantidos em gaiolas individuais, com temperatura ambiente de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo (12h claro/escuro) controlado. Os animais passaram por um período de adaptação de sete dias antes do estudo, durante todo o experimento foram mantidos em condições padronizadas com água potável e ração comercial *ad libitum*.

### **Tamanho Amostral**

Para calcular o tamanho amostral, foi utilizada a seguinte equação:

$$n = \left( z \times \frac{s}{e} \right)^2$$

n = número de elementos da amostra

z = valor tabelado obtido da Tabela da Distribuição Normal  $\rightarrow Z \sim N(0;1)$

s = desvio-padrão

e = erro padrão

O cálculo foi realizado considerando um nível de confiança de 99% e uma taxa de erro de 1,8%. Em relação ao desvio-padrão, usou-se  $s=0,0469$ , considerando o desvio-padrão obtido em trabalho semelhante (Tetila *et al.* 2019). O tamanho amostral obtido foi de 18 animais, sendo distribuídos em 06 animais cada grupo.

## Grupos de Pesquisa

Os 18 animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais, designados grupo controle (GC), grupo PRPa gel (GPRPaG) e grupo PRPa líquido (GPRPaL), contendo 06 animais cada. Esses animais foram submetidos aos tratamentos conforme descrito na Tabela I; acompanhados diariamente, e o processo de cicatrização avaliado nos momentos M0, M7, M14, M21 e M28 (28 dias).

**Tabela I.** Distribuição dos animais utilizados no experimento

Grupo	Animais	Lesões	Tratamento
GC	06	24	Solução de NaCl 0,9%
GRPPaG	06	24	PRPa gel
GPRPaL	06	24	PRPa líquido

**Fonte:** próprio autor

## Preparo do PRPa

Para a colheita de sangue os animais foram contidos manualmente e anestesiados, por via intramuscular (IM), com Cloridrato de Xilazina 2% (Xilazin<sup>®</sup> 2%) na dose de 5 mg/kg e Cloridrato de Cetamina 100mg/mL (Syntec<sup>®</sup>) na dose de 30 mg/kg (Kanashiro & Cassu 2008).

Foi coletado 10 mL de sangue da veia marginal auricular dos coelhos, utilizando scalp 23G (Ferreira *et al.* 2021). 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%), resultando em 5 ml de sangue total (ST) 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<sup>®</sup>).

Na primeira etapa de centrifugação, o ST foi centrifugado a 200 gravidades (G) (centrífuga *Excelsa II*, modelo 206-BL *Fanem*<sup>®</sup>) por 10 minutos, permitindo a formação de

três camadas: camada superior ou sobrenadante amarelado (plasma pobre em plaquetas-PPP); camada leucoplaquetária ou creme leucocitário esbranquiçado (onde se encontra maior parte das plaquetas, denominada ainda zona de névoa); e camada inferior vermelha (hemácias).

O plasma sobrenadante e a camada leucoplaquetária de cada um dos dois tubos foram pipetados e transferidos para tubos secos e estéreis para a realização da segunda etapa da centrifugação, a 400G por 10 minutos. Do sobrenadante,  $\frac{2}{3}$  foram descartados como PPP, e o  $\frac{1}{3}$  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  $1.000.000/\text{mm}^3$  para ser considerado plasma enriquecido (Souza *et al.* 2014, Ferraciolli *et al.* 2018).

Após constatação da concentração plaquetária adequada, parte do PRPa líquido foi transformado em gel adicionando gluconato de cálcio a 10%, na proporção de 4:1.

### **Indução das Feridas e Tratamentos**

Estando os animais anestesiados foi realizada a tricotomia da região dorsal de cada animal, por meio de um tricotomizador elétrico (AGC<sup>®</sup>), com lâmina número 40. Foi realizada antissepsia da pele com álcool 70%, administrado 1 ml de lidocaína 2% sem vasoconstritor via subcutâneo (SC) em cada área da ferida previamente demarcada (com caneta hidrográfica). Foram feitas quatro feridas circulares com auxílio de punch de 8mm e as mesmas identificadas como ferida 1 (F1), 2 (F2), 3 (F3) e 4 (F4) (Figura 1) (Bellini *et al.* 2015, Masi *et al.* 2016).

No GC, as feridas foram cobertas por curativo adesivo (Band-Aid<sup>®</sup>, Johnson & Johnson do Brasil-Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda); no GPRPaL uma aplicação de PRPa líquido intradérmico no volume de 0,1mL foi realizado na borda lateral direita e esquerda (total de 0,2mL) da lesão circular a cada 3 dias no total de 3 aplicações; e

no GPRPaG a ferida foi coberta com o PRPa gel a cada 3 dias no total de 3 aplicações, conforme protocolo estabelecido por Barrionuevo *et al.* (2015). Após tratamento, todas as feridas foram cobertas por curativo adesivo (Band-Aid<sup>®</sup>, Johnson & Johnson do Brasil-Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda).

Ao final do estudo (28 dias) os animais dos grupos experimentais foram anestesiados, conforme protocolo descrito anteriormente, e submetidos a eutanásia por meio de overdose anestésica de acordo com o Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais.

### **Cuidados Pós-Operatório**

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais onde foram monitorados todos os dias, durante todo o período de experimentação. A higienização das gaiolas, alimentação e troca da água foram realizadas regularmente. Para o controle da dor pós-cirúrgica, foi administrado via intramuscular, cloridrato de tramadol 50mg/mL (0,5 mg/kg), a cada 12 horas por 3 dias (Paolozzi *et al.* 2011).

### **Análises Morfológica e Morfométrica**

Foram realizadas avaliações clínico-morfológicas, morfométricas e fotográficas das feridas dérmicas na região dorsal, imediatamente após a lesão experimental, acompanhando-se nos momentos M0, M7, M14, M21 e M28 (28 dias) após o início do experimento.

Nas análises clínico-morfológicas foram observadas características como: cor da ferida, tecido de granulação, presença de crosta, úlcera, tecido necrótico, exsudação da ferida e característica do exsudato, sinais de inflamação e infecção, cujos escores estão indicados na tabela II.

**Tabela II.** Relação dos escores aplicados aos aspectos macroscópicos analisados das feridas induzidas em coelhos e tratadas com plasma rico em plaquetas autólogo líquido e gel.

<b>Aspecto</b>	<b>Escore</b>
Cor da Ferida	1 – Rósea
	2 – Amarelada
	3 – Pálida
	4 – Cianótica
	S.A. – Sem Avaliação
Borda da Ferida	0 – Sem Granulação
	1 – Com Granulação
	S.A. – Sem Avaliação
Crosta da Ferida	0 – Sem Crosta
	1 – Com Crosta
	S.A. – Sem Avaliação
Ulcera da Ferida	0 – Sem Ulcera
	1 – Com Ulcera
	S.A. – Sem Avaliação
Necrose	0 – Sem Necrose
	1 – Com Necrose
	S.A. – Sem Avaliação
Exsudato da Ferida	0 – Sem Exsudato
	1 – Com Exsudato
	S.A. – Sem Avaliação
Características do Exsudato	0 – Seroso
	1 – Sanguinolento
	2 – Purulento
	A – Ausente

Nota: S.A. - Sem avaliação

Fonte: próprio autor

A avaliação clínico-fotográfica das lesões foi realizada por método não invasivo, observada a partir da captura com um smartphone modelo Iphone 11, equipado com uma câmera de 12 megapixels (*Apple*<sup>®</sup>), com padronização em uma altura de 33,5cm e a análise de imagens pelo programa *Image J*<sup>®</sup> (versão 1.40g para *Windows*<sup>®</sup>), um programa de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband do *National Institutes of Health* (NIH) (Bellini *et al.* 2015). No momento da captura da imagem uma régua foi posicionada ao lado de cada animal fotografado o que permitiu a calibração do *software* e posterior análise computacional.

Para a análise morfométrica, a área da ferida foi mensurada com auxílio de paquímetro digital marca DC-60 *Western*<sup>®</sup> nos momentos acima citados, onde as medidas obtidas foram usadas para calcular o percentual da área remanescente de ferida em relação à área inicial (PAFR), utilizando-se a seguinte equação:

$$PAFR = \left(\frac{AM}{AI}\right) \times 100\%,$$

em que PAFR = 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 avaliação (Ferracioli *et al.* 2018).

Foi realizada a mensuração dos diâmetros maior e menor da ferida e, a partir desses elementos, foi calculada a área utilizando-se da equação matemática (Prata *et al.* 1988):

$$A = \pi \times R \times r,$$

onde A = área da ferida, R = raio maior, r raio menor e  $\pi$  = valor de pi (3,14), em seguida foi calculado o percentual de contração de cada lesão (Oliveira *et al.* 2000), onde a percentagem de contração (Pc) é igual a área final ( $A_f$ ) menos a área inicial ( $A_i$ ) vezes 100 (x100), dividido pela área inicial ( $A_i$ ) ou seja:

$$P_C = \frac{(A_f - A_i) \times 100}{A_i},$$

A determinação da percentagem de cicatrização (%C) foi calculada em  $\text{cm}^2$  para os diferentes períodos a partir da área das lesões calculadas pelo *Image J*<sup>®</sup>, aplicando-se a equação:

$$\%C = 100 - \left(\frac{A_f}{A_i}\right) \times 100,$$

onde  $A_f$  é a área final da lesão e  $A_i$  é a área inicial da lesão, ambas em  $\text{cm}^2$ .

### **Processamento e avaliação histológica das amostras**

Com objetivo de avaliar as fibras de colágenos tipo I e III, foi realizada biópsia de cada ferida (F1, F2, F3 e F4) nos momentos M7, M14, M21 e M28, respectivamente, com auxílio de um punch de 6mm de diâmetro, abrangendo a área central e borda das feridas (Vendramin *et al.* 2010), mediante a anestesia prévia dos animais, seguindo o mesmo protocolo para indução das feridas. As amostras de pele retiradas foram fixadas em solução de formol tamponado a 10%, por 24 horas, e em seguida, incluídas na parafina. Obtendo-se 4 cortes de 5 µm de espessura, de cada animal, que foram corados com Picrosirius-red F3BA, para quantificação e avaliação do colágeno (Lattouf *et al.* 2014).

### **Registro fotográfico das lâminas em microscópio**

Para a captação das imagens, foi utilizado microscópio de luz polarizada (*Leica* DMLB, São Paulo, SP, Brasil) acoplado a uma câmera (*Leica* DFC300 FX, São Paulo, SP, Brasil). As imagens observadas no microscópio foram projetadas em um monitor através de um *software* analisador de imagem (*Leica QWin Plus*, São Paulo, SP, Brasil). O sistema apresentou, na tela do computador, a imagem original digitalizada a partir da lâmina histológica e, ao lado, três histogramas de frequência das intensidades, vermelho, verde e azul. A partir desta representação, o sistema calculou as quantificações desejadas e todos os dados relativos a esses cálculos, que são apresentados em planilha própria do programa. Foram, então, selecionados aleatoriamente 3 campos da derme superficial (camada papilar) e 3 campos da derme profunda (camada reticular). As imagens foram capturadas com padronização em objetiva de aumento de 20 vezes, intensidade máxima de luz do microscópio e polarização em plano de 90°.

### **Análise da Dimensão Fractal (DF)**

A partir da coloração com Picrosirius-red F3BA, foi possível realizar uma análise quantitativa simples e sensível para medição de colágeno e proteínas contidas em cortes de tecido. Essa técnica permitiu a determinação e quantificação do colágeno maduro e imaturo. No sistema Red, Green, Blue (RGB) as fibras de colágeno tipo I (COL 1), maduras, mais espessas e fortemente birrefringentes, com cores intensas e contrastantes, indicando a presença de uma estrutura altamente organizada e anisotrópica, aparecem em amarelo, laranja e vermelho; enquanto as fibras do colágeno tipo III (COL 3), imaturas, mais finas, dispersas e fracamente birrefringentes, cores mais sutis e menos contrastantes, indicando uma estrutura menos organizada, aparecem em verde (Greca *et al.* 2009). Através desse método, é possível quantificar a área ocupada por cada tipo de colágeno em cada campo pré-determinado do corte histológico.

As lâminas histológicas coradas e fotografadas, foram binarizadas e submetidas a análise da dimensão fractal, utilizando método *box-counting*, por meio do *software Image J*<sup>®</sup> (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível gratuitamente na internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). O *software* considera duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de *pixels* nesse espaço, não considerando, portanto, a textura da imagem (Melo *et al.* unpublished data).

A influência disso é que duas imagens com a mesma distribuição dos *pixels*, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuem a mesma DF. A análise das lâminas histológicas, baseia-se na relação entre a resolução e a escala avaliada, sendo o resultado quantitativo expresso como a dimensão fractal do objeto que é  $DF = (\log Nr / \log r^{-1})$ ; onde Nr refere-se a quantidade de elementos iguais necessários para preencher o objeto original e r, a escala aplicada ao objeto. Desta forma, a dimensão fractal calculada com o *Image J*<sup>®</sup> fica sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes (Taniguchi *et al.* 2018).

## Análise Estatística

Quanto a análise morfológica, morfométrica e dimensão fractal, os grupos GPRPaG, GC e GPRPaL nos momentos M7, M14, M21 e M28 foram comparados pelo teste de *Shapiro-Wilk*; os diferentes tratamentos comparados pelo teste de *Kruskall-Wallis*; e dentro de cada grupo, com contrastes pelo método de *Dunn*. Os valores obtidos na avaliação termográfica foram organizados e expressos na forma de média e desvio padrão. As associações estatísticas foram determinadas usando o teste t de *Student*. Todas as análises foram conduzidas com auxílio do *software GraphPad Prism*<sup>®</sup> 5.0, considerando-se nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) são amplamente utilizados em estudos que avaliam o processo de cicatrização. A pele de coelho compartilha semelhanças histológicas e fisiológicas com a pele humana, o que permite uma melhor compreensão das respostas biológicas e dos processos de cicatrização. Além disso, a pele de coelho é relativamente fina e fácil de manusear, facilitando a realização dos experimentos. Sua resposta à lesão e cicatrização pode fornecer *insights* valiosos sobre como determinados agentes, como medicamentos ou terapias, podem afetar o processo de cicatrização cutânea em seres humanos (Cepeda *et al.* 2016, Masson-Meyers *et al.* 2020).

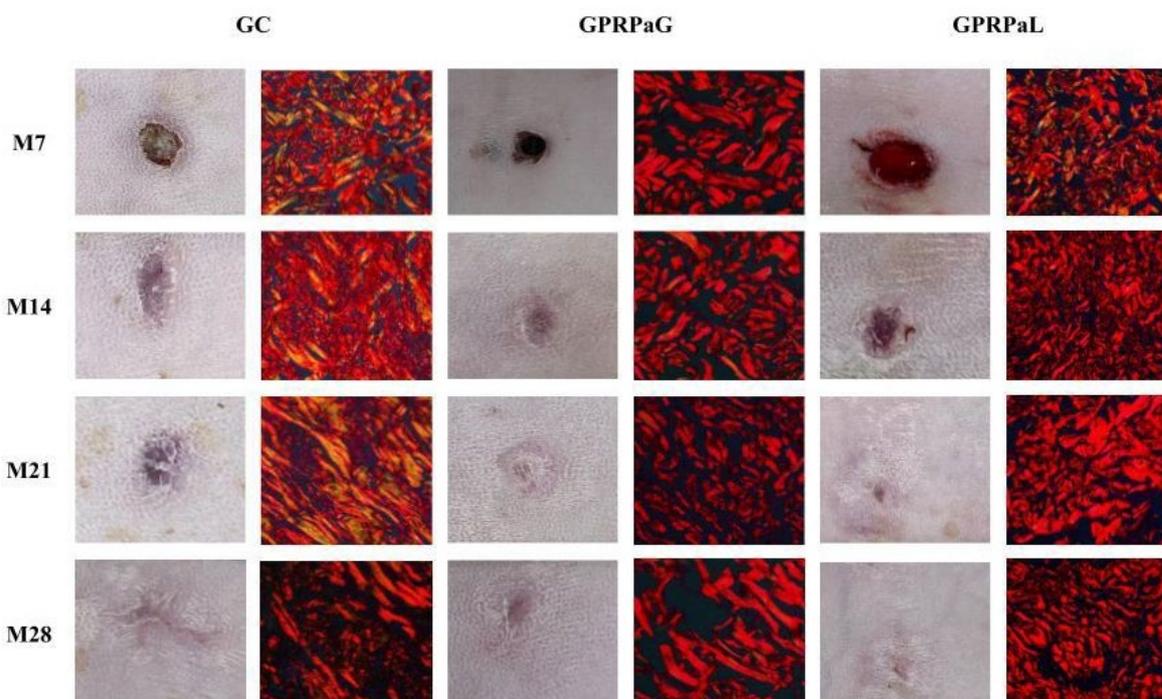
Feridas cirúrgicas são consideradas agudas (Sen *et al.*, 2017) e devem ser tratadas de forma a evitar a formação de biofilmes altamente organizados, que levam à cronicidade da ferida e falhas na cicatrização (Roy *et al.*, 2020). Neste estudo, todos os cuidados no pré-operatório, trans e pós cirúrgicos foram tomados para evitar complicações.

Estudos recentes apontam que o PRP tem capacidade antimicrobiana, bactericida ou bacteriostática, podendo ocorrer devido à capacidade do plasma rico em plaquetas de modular

a resposta imunológica e promover um ambiente propício à regeneração tecidual, reduzindo assim o risco de infecções (He, *et al.* 2022). Além disso, a concentração de leucócitos no PRP pode desempenhar um papel importante. Os leucócitos são células do sistema imunológico que ajudam na defesa do organismo contra infecções, podendo fortalecer a resposta imunológica local e auxiliar na eliminação de bactérias presentes na área de tratamento (Yuan, *et al.* 2022).

Os aspectos macroscópicos analisados, e a avaliação morfométrica das feridas demonstram que não houve diferença significativa entre os grupos, as feridas permaneceram róseas durante todos os momentos da fase experimental, com ausência de áreas necróticas, exsudato e edema, caracterizando ausência de sinais de infecção bacteriana.

Durante o M7 algumas das feridas do GC, GPRPaG e do GPRPaL apresentaram presença de tecido com granulação na borda da ferida e presença de crosta, dado isso, estas alterações diferiram apenas entre os momentos, demonstrada na figura I, e estende-se com a microscopia realizada dos momentos apresentados anteriormente, a fim de apresentar o arranjo de colágenos em luz polarizada.



**Figura I. Imagens das feridas dos coelhos e micrografia em luz polarizada das feridas no 7º, 14º, 21º e 28º dia de experimento das feridas do grupo GPRPaG - grupo plasma rico em plaqueta autólogo gel; GC - grupo controle; GPRPaL - grupo plasma rico em plaqueta autólogo líquido.**

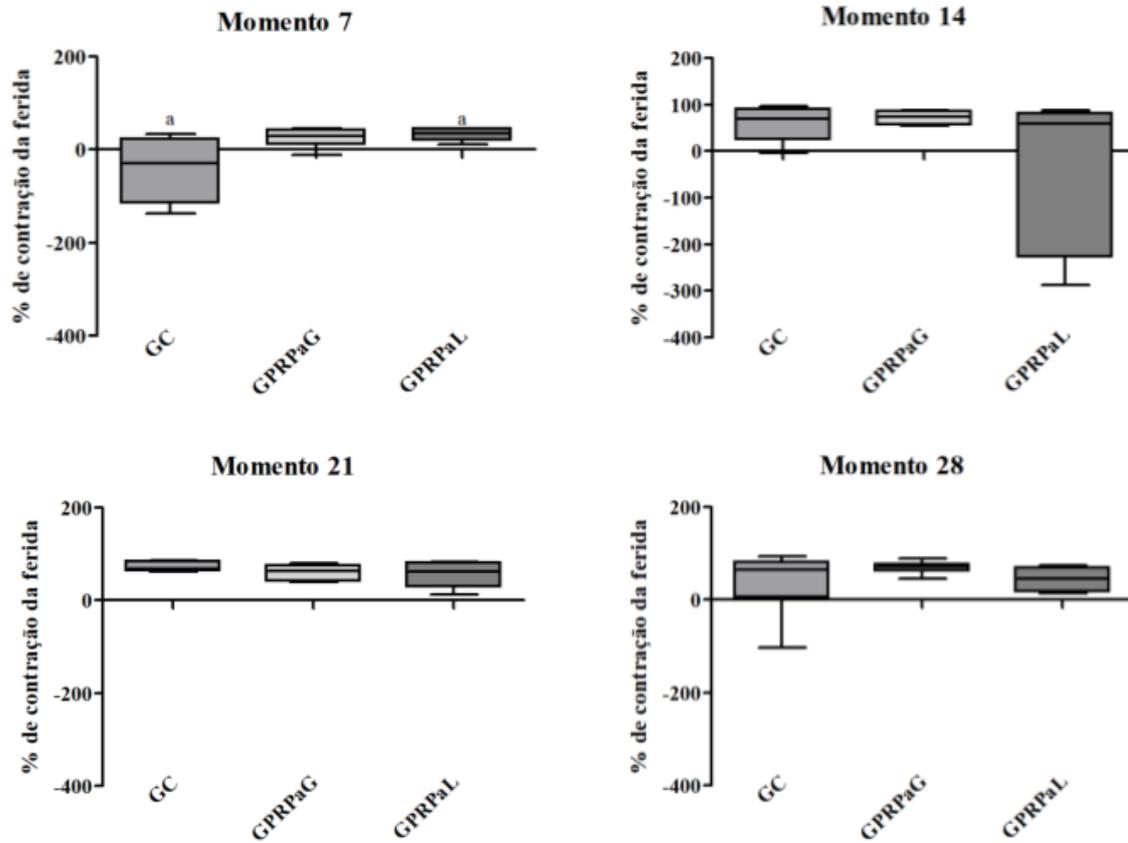
A avaliação dos tecidos por meio de microscopia óptica em lâminas histológicas, comumente empregada para examinar a morfologia geral dos tecidos, identificar células e avaliar possíveis alterações patológicas, não revelou sinais de necrose ou inflamação, indicativo de que os tecidos se mantiveram preservados e não apresentam danos significativos nessas áreas específicas, corroborando resultados de estudos anteriores, como demonstrado pelo estudo de Pixley *et al.* 2023.

O estudo de Solakoglu *et al.* 2020, ressalta que a concentração elevada de fatores de crescimento no PRP, estimulam a proliferação e atividade dos fibroblastos, promovendo a produção de colágeno, e também ao estímulo à angiogênese, promovendo a formação de novos vasos sanguíneos, facilitando o fornecimento adequado de nutrientes e oxigênio para os tecidos em regeneração, sendo categórico para o processo de cicatrização, especialmente em lesões mais extensas.

A ausência ou a falta de eficácia do colágeno pode impactar significativamente e adverso no processo de cicatrização, especialmente em pacientes com comorbidades, por diversos fatores, como o aumento do risco de infecção, diminuição da elasticidade, cicatrização mais lenta, formação de cicatrizes anormais, deficiência nos fatores de crescimento. O uso apropriado de terapias como o PRP deve ser considerado como parte integrante do plano de tratamento para otimizar os resultados de cicatrização e reduzir complicações (Palumbo *et al.* 2021).

Em estudo sobre os efeitos de diferentes fontes de PRP (autólogo, heterólogo e homólogo) em géis no processo de cicatrização de feridas cutâneas, Barrionuevo *et al.* (2015) concluíram que, independentemente da fonte, o uso desses produtos melhora e acelera a cicatrização. No entanto, em nosso estudo atual, observamos que o aspecto gel e líquido de PRP autólogo, embora não tenha havido uma aceleração perceptível no processo de cicatrização, apresentaram fibras colágenas mais organizadas e uniformes, podendo ser atribuída aos efeitos moduladores que o PRP exerce nos processos bioquímicos e biomecânicos durante a regeneração tecidual. Destacada a complexidade dos efeitos do PRP em avaliação microscópica e a importância de considerar não apenas a velocidade, mas também a qualidade da cicatrização tecidual.

Os dados referentes à percentagem de contração das feridas foram analisados de acordo com os tratamentos realizados e os momentos, estando apresentados na figura II.



**Figura II.** Análise gráfica da variável percentual da área de contração da ferida em relação à área inicial (PAFR) nos diferentes tratamentos e momentos. Média e desvio padrão de GPRPaG - grupo plasma rico em plaqueta autólogo gel; GC - grupo controle; GPRPaL - grupo plasma rico em plaqueta autólogo líquido. Gráficos apresentados em unidades aleatórias.

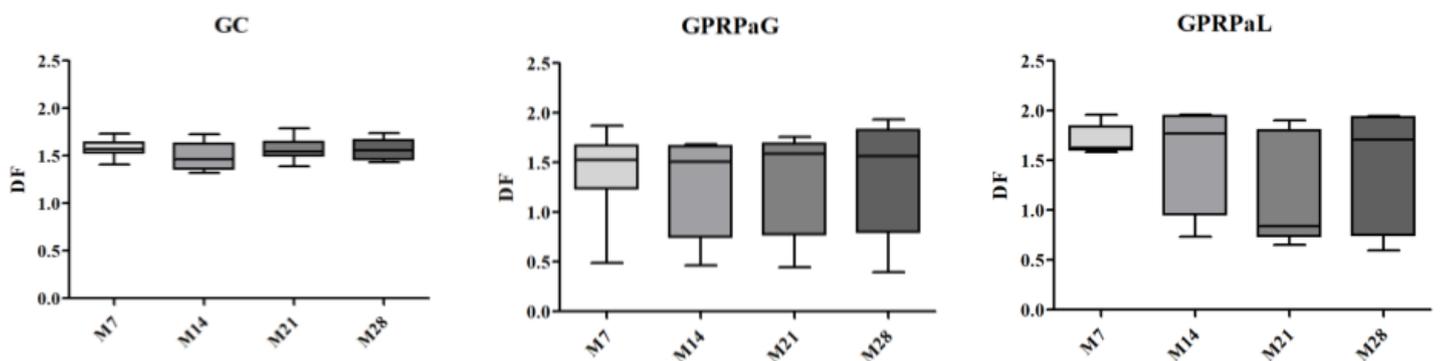
Percebe-se que a percentagem de contração durante o M7, houve uma diferença estatística ( $p=0,0342$ ) quando comparado as feridas do GC em relação ao GPRPaL, porém não diferiram estatisticamente durante a avaliação das feridas dos outros momentos (M14, M21 e M28). Para as feridas do GPRPaL, a redução da área foi mais expressiva a partir do M21, enquanto para a ferida do GPRPaG e do GC foi mais precoce, apresentando alteração desde o M14.

O PRP líquido permite uma distribuição mais direta dos fatores de crescimento contidos no PRP na área específica da ferida, o que pode resultar em uma ação mais rápida, mas talvez menos prolongada. No entanto, o PRP gel pode criar um ambiente em que os

fatores de crescimento são gradualmente liberados ao longo do tempo. Dependendo da condição da ferida, onde lesões mais profundas ou localizadas em camadas específicas dos tecidos podem ser mais efetivamente tratadas com o método injetável, uma entrega mais direta de fatores de crescimento, garantindo uma melhor regulação da síntese e remodelação do colágeno e qualidade da cicatrização, permitindo o alcance da área e reparo com maior precisão, já as lesões mais superficiais ou que abrangem uma área maior podem se beneficiar da aplicação tópica em gel.

Rezende, *et al.*, (2020), verificaram que o uso de plasma rico em plaquetas acelera o processo cicatricial em associação à uma pomada comercial, por meio de uma avaliação macro e microscópica, onde demonstram que a existência na variação nos resultados pode estar vinculada à localização específica da lesão induzida. Regiões com menor vascularização podem experimentar atraso no processo de cicatrização, influenciado pela qualidade e viabilidade do PRP gerado.

Os resultados da dimensão fractal do colágeno das lâminas coradas por *Picrosirius* e referentes aos diferentes tratamentos estão expressos na figura III.



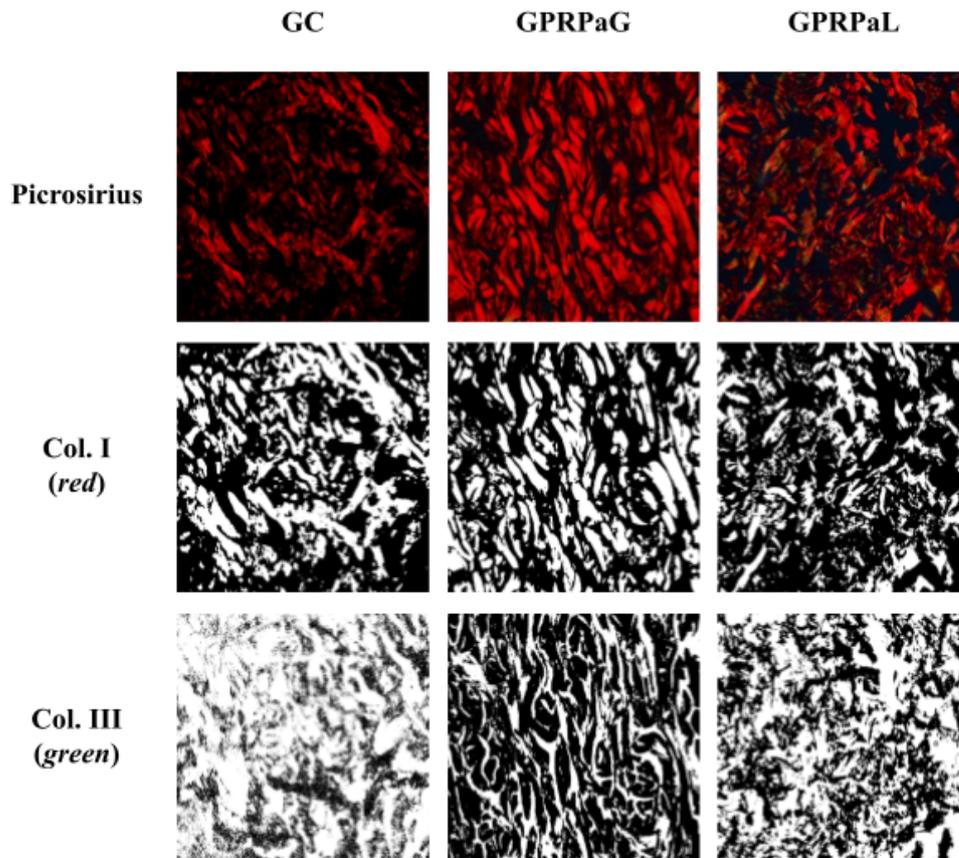
**Figura III. Análise gráfica da dimensão fractal (DF) nos diferentes tratamentos e momentos do grupo GPRPaG - grupo plasma rico em plaqueta autógeno gel; GC - grupo controle; GPRPaL - grupo plasma rico em plaqueta autógeno líquido.**

Na análise de dimensão fractal, não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) do colágeno tipo I (Col. I) e do colágeno tipo III (Col. III), avaliadas de acordo com os momentos (M7, M14, M21 e M28) intragrupos, porém o colágeno demonstrou média com limite superior para o grupo GPRPaL, o que caracteriza uma estrutura tecidual pouco mais complexa, ou seja, com menor colagenização e a disposição e qualidade das fibras está relacionada a uma menor retração da ferida e cicatrização heterogênea. Em situações em que o tecido passa por lesões agudas ou é submetido a intervenções terapêuticas, uma dimensão fractal maior pode indicar uma reorganização dinâmica do colágeno em resposta a esses estímulos (Vendramin *et al.*, 2010).

No decorrer do estudo, enfrentamos desafios inesperados que impactaram nossos resultados estatísticos. Durante o M21, o GPRPaL demonstrou uma diminuição da média da DF, o que pode estar relacionado à mordida na área da ferida por um dos animais avaliados, comprometendo a integridade da avaliação, incluindo variabilidades imprevistas. Além disso, a eutanásia de um dos animais foi uma decisão ética necessária, porém, trouxe consigo a perda de dados para análise, o que pode, de fato, ter influência nos resultados obtidos.

Em análise microscópica, a coloração de picrosirius sob luz polarizada garantiu a visualização de estruturas colágenas tipo I, demonstrada pela birrefringência laranja-avermelhada e do colágeno tipo III, com birrefringência verde. A dimensão fractal é uma ferramenta que tem sido usada para diagnóstico em diferentes áreas como oftalmologia, oncologia, neurologia, cardiologia, sendo muito útil para caracterizar estruturas irregulares, porém é uma avaliação bidimensional. Cabe ressaltar que recente estudo, mostrando o colágeno nos casos de fibrose, sugere o uso da análise fractal tridimensional com o objetivo de mostrar alterações não só de conteúdo de colágeno mas de estrutura e arranjo topográfico (Dylan *et al.*, 20023).

Nos grupos GPRPaL e GPRPaG, as fibras colágenas do tipo I, foram mais distinguíveis e dispostas regularmente do que as fibras colágenas do tipo III (imaturo), que estavam distribuídas de forma irregular, quando comparadas (figura IV).



**Figura IV. Micrografias em luz polarizada de feridas do GPRPaG, GC e GPRPaL, onde tem-se a seleção da área binarizada correspondente ao colágeno tipo I (red) - Col. I; e ao colágeno tipo II (green) - Col. III; em comparação com a área total do colágeno.**

Conclui-se que tanto na avaliação da percentagem de contração, como na análise de dimensão fractal, os métodos utilizados demonstraram-se eficazes para caracterizar a evolução da cicatrização de feridas dérmicas; todos os tratamentos foram satisfatórios e contribuíram com a reparação tecidual que ocorreu sem nenhum sinal de complicação secundária; o GPRPaG e GPRPaL demonstraram uma menor dimensão fractal, sustentando a hipótese de que o uso do PRP favoreça uma organização mais regular e menos complexa das fibras colágenas, com disposição mais homogênea, com menos variação em termos de direção

e densidade, quando comparado com o GC que mostrou maior dimensão fractal, sugerindo uma matriz de colágeno menos madura e mais dinâmica, indicando a heterogeneidade das fibras colágenas.

## AGRADECIMENTOS

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

## REFERENCES

BARRIONUEVO DV, LAPOSY CB, ABEGÃO KG, NOGUEIRA RMB, NAI GA, BRACALE BN, DELFIM IG. 2015. Comparison of experimentally-induced wounds in rabbits treated with different sources of platelet-rich plasma. *Lab. Anim.*, v.49, p.209-214.

BELLINI MZ, OLIVA-NETO P, MORAES AM. 2015. Properties of films obtained from biopolymers of different origins for skin lesions therapy. *Braz Arch Biol Technol* 58: 289–299.

BERNATCHEZ SF, BICHEL J. 2023. The Science of Skin: Measuring Damage and Assessing Risk. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. Apr;12(4):187-204. doi: 10.1089/wound.2022.0021. Epub 2022 Sep 1. PMID: 35904378; PMCID: PMC9885549.

BUZALAF MAR, LEVY FM. 2022. Autologous platelet concentrates for facial rejuvenation. *J Appl Oral Sci*. Sep 5;30:e20220020. doi: 10.1590/1678-7757-2022-0020. PMID: 36074433; PMCID: PMC9444188.

CEPEDA AMC, CAMPOS AC, ERZINGER GFD, BALBINOT P. 2016. Efeitos da radiofrequência na cicatrização de feridas cutâneas em ratos: análise por planigrafia digital e avaliação histológica. Dissertação mestrado em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

DYLAN TC, KAROLYN GL, VITOR M, JACOB H, JOSEPH KH, BELA S, YVONNE MW, JANSSEN-HEININGER, JASON HTB. 2023. Local Fractal dimension of collagen detects increased spatial complexity in fibrosis. *Histochemistry and Cell Biology*. p. 1-14.

FERRACIOLLI E, LAPOSY CB, NOGUEIRA MR, JUSTULIN JÚNIOR LA, CAMARGO FILHO JC, MOREIRA V, MARQUES ME, NAI G, OZAKI G. 2018. Evaluation of collagen fibers of rabbit dermal wounds treated with different sources of platelet-rich plasma. *Arq Bras Med Vet Zootec* 70: 1179–1186.

FERREIRA NGO, VICENTINI YF, BREDA MRS, NOGUEIRA RMR, NAI GA, SANTARÉM CL. 2021. Uso de biomateriais e rosuvastatina tópica aumenta angiogênese de feridas cirúrgicas em coelhos. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 1, e32510111327. doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11327>

- GAO J, GUO Z, ZHANG Y, LIU Y, XING F, WANG J, LUO X, KONG Y, ZHANG G. 2022. Age-related changes in the ratio of Type I/III collagen and fibril diameter in mouse skin. *Regen Biomater*. Dec 29;10:rbac110. doi: 10.1093/rb/rbac110. PMID: 36683742; PMCID: PMC9847517.
- GARCIA-ORUE I, SANTOS-VIZCAINO E, SANCHEZ P, GUTIERREZ FB, AGUIRRE JJ, HERNANDEZ RM, IGARTUA M. 2022. Bioactive and degradable hydrogel based on human platelet-rich plasma fibrin matrix combined with oxidized alginate in a diabetic mice wound healing model. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. Apr;135:112695. doi: 10.1016/j.msec.2022.112695. Epub 2022 Feb 3. PMID: 35581070.
- GRECA FH, RAMOS EJB, DALLOLMO VC. 2009. The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: a systematic review. *Injury* 40: 158-162.
- HE M, ET AL. 2022. The role of allogeneic platelet-rich plasma in patients with diabetic foot ulcer: Current perspectives and future challenges. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 Sep 29;10:993436. doi: 10.3389/fbioe.2022.993436. PMID: 36246379; PMCID: PMC9557159.
- HSU YC, FUCHS E. 2022. Building and Maintaining the Skin. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Jul 1;14(7):a040840. doi: 10.1101/cshperspect.a040840. PMID: 34607830; PMCID: PMC8977401.
- HUMPHREY S, MANSON BROWN S, CROSS SJ, MEHTA R. 2021. Defining Skin Quality: Clinical Relevance, Terminology, and Assessment. *Dermatol Surg*. 2021 Jul 1;47(7):974-981. doi: 10.1097/DSS.0000000000003079. PMID: 34148998; PMCID: PMC8231670.
- JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. 2014. Basic histology: text and atlas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 12: 359-370.
- KANASHIRO GP, CASSU RN. 2008. Anesthesia in wild and laboratory animals. In: ANDRADE SF. *Veterinary Therapeutics Manual*. São Paulo: Roca, 3: 728–745.
- LATTOUF R, LATTOUF R, YOUNES R, LUTOMSKI D, NAAMAN N, GODEAU G, SENNI K, CHANGOTADE S. 2014. Picrosirius Red Staining: A Useful Tool to Appraise Collagen Networks in Normal and Pathological Tissues. *J Histochem Cytochem* 62: 751–758.
- MARQUES MEM, ET AL. 2017. Collagen quantification in rabbit dermal wounds treated with heterologous platelet-rich plasma gel. *Semin Cienc Agrar* 38: 249–258.
- MASI ECDJ, CAMPOS ACL, MASI FDJ, RATTI MAS, SHIN-IKE I, MASI RDJ. 2016. The influence of growth factors on rat skin wound healing. *Braz J Otorhinolaryngol* 82: 512–521
- MASSENAPB, PORTO CD, NUNES LC, SEQUEIRA JL, ALVARENGA MA. 2010. Myofibroblasts: A Literature Review. *Vet and Zootec* 17: 177-190
- MASSON-MEYERS DS, ANDRADE TAM, CAETANO GF, GUIMARÃES FR, LEITE MN, LEITE SN, FRADE MAC. 2020. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *Int J Exp Pathol*. 2020 Feb;101(1-2):21-37. doi: 10.1111/iep.12346. Epub 2020 Mar 30. PMID: 32227524; PMCID: PMC7306904.
- MELO AF, DANTAS VM, CHAVAGLIA SRR, BARBOSA MH, JÚNIOR MAF, BARRICHELLO E. 2019. Construction, validation and reliability of an instrument for evaluation and evolution of chronic wounds. *Biosci J* 35: 1290–1299

- OLIVEIRA IVPM, DIAS RVC. 2012. Wound healing: stages and influencing factors. *Acta Veterinaria Brasilica*, 6(4): 267-271.
- OLIVEIRA ST, LEME MC, PIPPI NL, RAISER AG. 2000. Formulations of confrei (*Symphytum officinale* L.) in the healing of rat skin wounds. *Rev FZVA* 7: 65-74.
- PALACIO EP, SCHIAVETTI RR, KANEMATSU M, IKEDA TM, MIZOBUCHI RR, GALBIATTI JA. 2016. Efeitos do plasma rico em plaquetas na epicondilite lateral do cotovelo: Estudo prospectivo, randomizado e controlado. *Rev Bras Ortop*; 51: 90–95
- PALUMBO VD, RIZZUTO S, DAMIANO G, FAZZOTTA S, GOTTARDO A, MAZZOLA G, LO MONTE AI. 2021. Use of platelet concentrate gel in second-intention wound healing: a case report. *J Med Case Rep*. Feb 18;15(1):85. doi: 10.1186/s13256-020-02649-6. PMID: 33597001; PMCID: PMC7890957.
- PAOLOZZI RJ, CASSU RN, CRUZ FSF, PARRILHA LR. 2011. Different doses of tramadol in dogs: analgesic, sedative and cardiorespiratory actions. *Cienc Rural* 41: 1417–1423
- PIXLEY JN, COOK MK, SINGH R, LARRONDO J, MCMICHAEL AJ. 2023. A comprehensive review of platelet-rich plasma for the treatment of dermatologic disorders. *J Dermatolog Treat*. Dec;34(1):2142035. doi: 10.1080/09546634.2022.2142035. PMID: 36318219.
- PRATA MB, HADDAD CM, GOLDENBERG S, SIMÕES MJ, MOURA LA, TRABULSI LR. 1988. Topical use of sugar in cutaneous wound. Experimental study in rat. *Acta Cir Bras* 3: 43-48.
- REZENDE RS, EURIDES D, ALVES EGL, VENTURINI GC, FELIPE RL. 2020. Co-treatment of wounds in rabbit skin with equine platelet-rich plasma and a commercial ointment accelerates healing. *Cienc. anim. bras.*, v.21, e-56274
- RIBEIRO G, MARTINS CB, SILVA MAG, BORGES VP, LACERDA NETO JC. 2009. Topical use kentaserin on healing of experimentally-induced skin wounds in horses. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2009; 61(1): 144-148.
- ROY S, SANTRA S, DAS A, SRITEIA D, MITHUN S, SUBHADIP G, NANDINI, G, PRADPTA B, SAVITA K, SHOMITA MS, PIVA DG, BRITANI NB, HEATHER MP, VALERIE KB, DANIEL JW, CHANDAN KS. 2020. Staphylococcus aureus Biofilm Infection Compromises Wound Healing by Causing Deficiencies in Granulation Tissue Collagen. *Ann Surg*; 271: 1174-1185.
- SEN CK, ROY S, GORDILLO G. 2017. Wound healing (Neligan Plastic Surgery: vol 1, Elsevier; Amsterdam, The Netherlands.
- SOLAKOGLU Ö, HEYDECKE G, AMIRI N, ANITUA E. 2020. The use of plasma rich in growth factors (PRGF) in guided tissue regeneration and guided bone regeneration. A review of histological, immunohistochemical, histomorphometrical, radiological and clinical results in humans. *Ann Anat*. Sep;231:151528. doi: 10.1016/j.aanat.2020.151528. Epub 2020 May 4. PMID: 32376297.
- SOUZA MV, PINTO JO, COSTA MBM, ALVES MS, SILVA MO, MARTINHO KO, FIETTO LG. 2014. Collagen gene expression in equine skin wound treated with platelet-rich plasma. *Pesqui Vet Bras* 34: 233–240.

TANIGUCHI BAL, BREDA, MRS, NOGUEIRA RMB, NAI GA, LAPOSY CB. 2018. Fractal analysis of rabbit dermal wounds treated with platelet-rich plasma and rosuvastatin. *Int J Clin Exp Pathol* 11: 5241–5248.

TETILA AF, BREDA MRS, NOGUEIRA RMB, NAI GA, LAPOSY CB. 2019. The Use of Platelet-Rich Plasma and Rosuvastatin in Wound Healing in Rabbits: A Longitudinal Study. *Adv Skin Wound Care* 32:1–5.

USTAOĞLU G, GÖLLER BULUT D, GÜMÜŞ KÇ. 2020. Evaluation of different platelet-rich concentrates effects on early soft tissue healing and socket preservation after tooth extraction. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* Nov;121(5):539-544. doi: 10.1016/j.jormas.2019.09.005. Epub 2019 Sep 14. PMID: 31526905.

VENDRAMIN FS, FRANCO D, FRANCO TR. 2010. Use of autologous platelet-rich plasma in skin graft surgeries in chronic wounds. *Rev Bras Cir Plast* 25: 589–594.

WHITE C, BRAHS A, DORTON D, WITFILL K. 2021 Platelet-Rich Plasma: A Comprehensive Review of Emerging Applications in Medical and Aesthetic Dermatology. *J Clin Aesthet Dermatol.* Nov;14(11):44-57. PMID: 34980960; PMCID: PMC8675348.

YUAN Z, WANG Y, LI Y, LIN C, WANG S, WANG J, MA C, WU S. 2023. Comparison of Leukocyte-Rich and Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma on Pressure Ulcer in a Rat Model. *J Burn Care Res.* Jul 5;44(4):860-868. doi: 10.1093/jbcr/irac191. PMID: 36591959; PMCID: PMC10321391.

## ANEXO A - APROVAÇÃO ÉTICA

### 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 "**BIOPOLÍMERO DE QUITOSANA/XANTANA/B-GLICANA E PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO NO TRATAMENTO DE FERIDAS: ANÁLISE FRACTAL E TERMOGRÁFICA**", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 6157 e tendo como participante(s) VALTER DIAS DA SILVA (discente), PAMELLA GODINHO GUTIERRES (discente), MÁRCIA ZILIOI BELLINI (participante externo), CECILIA LAPOSY SANTAREM (docente), ELISANGELA OLEGÁRIO DA SILVA (docente), ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (orientador responsável), foi avaliado e **APROVADO** pelo **COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI)** e **COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA)** da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido **APROVADO** em reunião realizada em 12/08/2020.

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

#### ANIMAL VIVO

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Coelho (Nova Zelândia)	22	3,5 quilos	150 dias	M	Biotério Unoeste
Coelho (Nova Zelândia)	22	3,5 quilos	150 dias	F	Biotério Unoeste

Presidente Prudente, 14 de Agosto de 2020.

Prof. D. Jair Rodrigues Garcia Jr.  
Coordenador Científico da CPDI

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

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação – CPDI – 18 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/spp](http://www.unoeste.br/spp) informando o código de segurança **ba872f887a31702ba49da3fa61553701**

## **ANEXO B - NORMAS DA REVISTA**

### **Instruções aos autores**

---

O periódico Anais da Academia Brasileira de Ciências considera para publicação as submissões feitas exclusivamente pelo sistema online de gerenciamento de artigos. Uma vez que seu artigo esteja de acordo com as instruções abaixo, favor acessar o sistema no link <https://mc04.manuscriptcentral.com/aabc-scielo>.

Por favor, leia estas instruções com atenção e as siga rigorosamente. Desta forma você irá garantir que a avaliação e a publicação de seu artigo sejam o mais eficiente e veloz quanto possível. Os editores reservam-se ao direito de devolver artigos que não estejam de acordo com estas instruções. Apesar de dispormos de uma página de instruções em português, lembramos que só consideramos para submissão, avaliação e publicação os artigos redigidos de forma clara e concisa na língua inglesa.

### **Objetivo e política editorial**

Todos os manuscritos submetidos devem conter pesquisa original que não tenha sido publicada ou esteja sob consideração em outro periódico. O critério primário para aceitação é qualidade científica. Artigos devem evitar o uso excessivo de abreviações ou jargões, além de ser tão inteligíveis quanto possível para o público em geral. Deve ser dada atenção particular às seções Abstract, Introduction e Discussion, as quais devem detalhar a novidade e significância dos dados relatados. Não cumprir com qualquer um dos pontos acima pode causar atraso na publicação ou até mesmo a recusa do artigo.

Textos podem ser publicados em forma de revisão, artigo completo ou como comunicação curta (short communications). Os volumes regulares dos AABC são publicados em março, junho, setembro e dezembro.

### **Tipos de artigos**

#### **Revisões**

Revisões são publicadas apenas por meio de convite, tendo ainda que passar pelo processo de revisão por pares. Contudo, uma proposta de revisão pode ser enviada por e-mail para a Assessoria de publicações ([aabc@abc.org.br](mailto:aabc@abc.org.br)). O e-mail deve conter os tópicos e autores da revisão proposta, bem como o abstract, área dos AABC na qual o artigo se encaixa e a justificativa pela qual este tópico seria de particular interesse à área.

Os AABC permitem que os autores depositem preprints de seus artigos em servidores de preprint tais como, mas não limitados a, ArXiv.org e bioRxiv.org. Contudo, autores devem atualizar os registros informando que o artigo foi aceito/publicado pelos AABC.

#### **Cartas ao editor**

Cartas ao editor (Letters to the Editor) estarão sujeitas à edição e revisão, não podendo conter material que tenha sido submetido ou publicado em outro periódico. Cartas que venham a se referir a um artigo publicado nos AABC não podem exceder 250 palavras

(não contando com referências) e devem ser recebidas em até 4 semanas após a publicação online do artigo. Cartas não relacionadas a um artigo publicados pelos AABC não podem exceder 500 palavras (não contando com referências). Uma carta não pode ter mais de dez referências, além de uma figura ou tabela.

### **Articles**

Sempre que possível, artigos devem estar subdivididos nas seguintes partes: 1. Página de rosto; 2. Abstract (em página separada, 200 palavras ou menos, sem abreviações); 3. Introduction; 4. Materials and Methods; 5. Results; 6. Discussion; 7. Acknowledgments, se aplicável; 8. Author contributions (se o artigo tiver mais de um autor); 9. References; 10. Legendas de figuras e tabelas, se aplicável. Artigos de algumas áreas, como por exemplo Ciências Matemáticas, devem seguir seu format padrão. Em alguns casos, pode ser aconselhável omitir a seção (4) e juntar as partes (5) e (6). Quando aplicável, a seção Materials and Methods deve indicar o Comitê de Ética que avaliou os procedimentos para estudos em seres humanos ou as normas seguidas para tratamentos experimentais em animais.

### **Short communications**

Short communications procuram relatar uma importante e concisa contribuição para pesquisa, a qual progrediu para o estágio em que os resultados devem ser tornados públicos para outros pesquisadores do mesmo campo. Uma short communication também deve possuir Abstract (100 palavras ou menos, neste caso), uma pequena introdução (até 200 palavras) e não pode exceder 1500 palavras. Tabelas e Figuras podem ser incluídas no texto, mas este deve ser proporcionalmente reduzido. Este tipo de publicação nos AABC deve conter contribuições extremamente relevantes, sendo um tipo de artigo com alta competição.

Após recebimento e primeira triagem editorial, artigos serão avaliados por pelo menos dois revisores, sendo eles de instituições educacionais e/ou de pesquisa tanto nacionais quanto internacionais, desde que comprovada sua produção científica. Após possíveis correções e sugestões, o artigo pode ser aceito ou recusado, considerando os pareceres recebidos.

Nós utilizamos o programa integrado Crossref Similarity Check para detectar possíveis plágios.

Os AABC não possuem taxas de submissão, avaliação e publicação de artigos.

### **Preparação de manuscritos**

Todas as seções do manuscrito devem possuir espaçamento duplo. Após o aceite, nenhuma mudança será feita no artigo, de modo que as provas de prelo precisem apenas de correções em erros tipográficos. Lembramos que o envio de artigos é feito exclusivamente pelos autores através do nosso sistema de gerenciamento de artigos.

### **Tamanho do artigo**

Os artigos podem ser de qualquer tamanho necessário para a apresentação e discussão concisa dos dados, mas mantendo-se conciso e cuidadosamente preparado tanto em termos de impacto quanto de legibilidade. No entanto, artigos não devem exceder 50

páginas, incluindo todos os itens (figuras, tabelas, referências, etc.), a menos que possua autorização prévia do Editor-Chefe.

### **Página de rosto**

A página de rosto do artigo deve apresentar os seguintes itens: 1. Título do artigo com até 150 caracteres, sem abreviações e com a tentativa de manter o interesse amplo da comunidade científica; 2. Nomes completos de todos os autores. Utilize números sobrescritos para indicar a filiação de cada autor. 3. Endereços profissionais e ORCID de todos os autores, incluindo instituição, departamento, rua, número, CEP, cidade, estado e país; 4. Key words (de 4 a 6 em ordem alfabética e separadas por vírgulas); 5. Running title (versão resumida – e não abreviada - do título com até 50 caracteres, incluindo espaços); 6. Seção dos AABC à qual o artigo pertence; 7. Nome, endereço, telefone e e-mail do autor para correspondência, a quem serão enviadas as mensagens mais relevantes do processo de avaliação. Este autor ou autora deve ser indicado com um asterisco após seu nome.

Não cumprir com qualquer dos requisitos acima fará com que o artigo seja devolvido (unsubmitted) para correções.

### **Abstract**

O abstract deve conter até 200 palavras e apresentar as principais descobertas do artigo, incluindo uma breve introdução, os objetivos do trabalho e uma conclusão baseada nas presentes descobertas. Caso os autores estejam submetendo uma revisão convidada/autorizada, o abstract deve abordar o principal tema da revisão e explicitar a contribuição de tal revisão à área. O abstract não deve possuir títulos nem citações/referências.

### **Texto do manuscrito**

Todo o texto deve ser escrito com espaçamento duplo utilizando a fonte Times New Roman tamanho 12 ou equivalente, desde que mantida a legibilidade. Por favor, organize seu texto nas seguintes partes sempre que possível: 1. Página de rosto; 2. Abstract (em página separada, 200 palavras ou menos, sem abreviações); 3. Introduction; 4. Materials and Methods; 5. Results; 6. Discussion; 7. Acknowledgments, se aplicável; 8. Author contributions (se o artigo tiver mais de um autor); 9. References; 10. Legendas de figuras e tabelas, se aplicável.

Artigos de algumas áreas, como por exemplo Ciências Matemáticas, devem seguir seu formato padrão. Em alguns casos, pode ser aconselhável omitir a seção (4) e juntar as partes (5) e (6). Quando aplicável, a seção Materials and Methods deve indicar o Comitê de Ética que avaliou os procedimentos para estudos em seres humanos ou as normas seguidas para tratamentos experimentais em animais.

Todos os procedimentos devem ser detalhadamente descritos. Utilize inglês norte-americano para escrever o texto. Nomenclaturas da área de Química devem ser fornecidos de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Cepas de organismos também devem estar identificadas. Informe nomes de fornecedores de reagentes e/ou equipamentos. Utilize unidades e símbolos de acordo com o Bureau International des Poids et Mesures (SI) sempre que possível.

### **Acknowledgments**

Devem ser incluídos ao fim do texto, antes das referências. Agradecimentos pessoais devem preceder nomes de instituições e agências. De forma ideal, notas de rodapé devem ser evitadas, mas, quando necessário, devem estar numeradas. Agradecimentos a financiamentos, subsídios, bolsas de estudo e dívidas com outros colegas, bem como menções à origem do artigo (como uma tese, por exemplo), devem estar nesta seção. Favor incluir o nome completo da agência de fomento, país e número do projeto (se aplicável).

### **Abreviações**

Devem ser definidas em sua primeira ocorrência no texto, exceto por abreviações padrão e oficiais. Unidades e seus símbolos devem estar em conformidade com as aprovadas pelo Bureau International des Poids et Mesures (SI).

### **Legendas de figuras**

Esta informação deve ser fornecida ao fim do manuscrito, após as referências. Todas as figuras devem conter legenda. A legenda deve possuir uma sentença introdutória que descreve as principais descobertas. Todas as divisões na figura devem ser identificadas com letras minúsculas, quando aplicável (1a, 2a, 2b, 3c, 3d, etc.). Quando for o caso da utilização de barras de erro, favor informar se um número que vem após o símbolo  $\pm$  é um Standard Error Of Mean (SEM) ou standard deviation of mean (SD). Deve ser informado na legenda se o resultado apresentado representa N experimentos individuais.

### **Tabelas**

Cada tabela deve possuir um pequeno título acima da mesma. Notas abaixo da tabelas também pode ser utilizadas. Tabelas devem ser citadas no artigo em algarismos romanos (Table I, Table II, Tables IV and V, etc.). Tabelas devem ser submetidas separadamente em arquivos editáveis, preferencialmente .doc ou .docx.

### **Figuras**

Só serão aceitas figuras de alta qualidade (mínimo de 300 dpi). Todas as ilustrações serão consideradas figuras, incluindo desenhos, gráficos, mapas, fotografias, esquemas, etc. Seu posicionamento tentativo deve ser indicado, assim como todas as figuras devem ser citadas com seu respectivo número ao longo do texto. Figuras devem ser enviadas de acordo com as seguintes especificações: 1. Desenhos e ilustrações devem estar em formato .PS/.EPS ou .CDR (PostScript ou Corel Draw) e nunca inseridas no texto; 2. Imagens ou figuras em escala de cinza devem estar em formato .TIF e nunca inseridas no texto; 3. Cada figura deve ser enviada em arquivo separado; 4. Figuras devem, a princípio, ser submetidas no tamanho em que espera-se que estejam publicadas no periódico, ou seja, largura de 8cm (uma coluna) ou 16,2cm (duas colunas), com a altura máxima de cada figura e respectiva legenda sendo menor ou igual a 22cm.

As legendas das figuras devem ser enviadas com espaçamento duplo em página separada. Cada dimensão linear dos menores caracteres e símbolos não pode ser menor que 2mm após redução. Figuras coloridas são aceitas tanto como figuras em preto e branco. No entanto, 5 figuras em p/b são sem custo aos autores, enquanto cada figura colorida na versão impressa será cobrada dos autores, com a comunicação sendo feita durante a fase de produção (após o processo de avaliação). De modo a

padronizar a contagem e cobrança de figuras preto e branco, tabelas que ocupem dois terços da página ou que tenham mais que 12 colunas ou 24 colunas serão consideradas figuras p/b. Manuscritos de Matemática, Física ou Química podem ser redigidos em TEX, AMS-TEX ou LaTeX, desde que o arquivo .BIB seja enviado junto. Manuscritos sem fórmulas podem ser enviados em .RTF ou doc/docx para Windows.

## Referências

Os autores são responsáveis pela exatidão das referências, bem como suas respectivas citações. Artigos publicados ou ainda 'In press' podem ser incluídos. Comunicações pessoais (Smith, personal communication) devem ser autorizadas por escritos pelos envolvidos. Referências a teses, abstracts de encontros (não publicados em jornais indexados) e manuscritos em preparação ou apenas submetidos, mas não ainda aceitos, devem ser citados no texto no formato (Smith et al., unpublished data) e NÃO devem ser incluídos na lista de referências.

Referências devem ser citadas no texto no formato a seguir sem a aspa simples, 'Smith 2004', 'Smith & Wesson 2005' ou, quando há 3 ou mais autores, 'Smith et al. 2006'. Quando houver dois ou mais artigos cujo nome do primeiro autor e ano de publicação são idênticos, as referências devem ser diferenciadas por letras minúsculas, como em 'Smith 2004a', 'Smith 2004b', etc.

As referências devem ser listadas alfabeticamente de acordo com o nome do primeiro autor, sempre na ordem SOBRENOME XY, sendo X e Y as iniciais. Se há mais de 10 autores na referência, usar SOBRENOME XY ET AL., sem listar os demais autores. Referências devem conter também o título do artigo. Os nomes dos periódicos devem estar abreviados sem itálico, pontos ou vírgulas. Para as abreviações corretas, verifique listas das maiores bases de dados nas quais o periódico está indexado, ou consulte a World List of Scientific Periodicals. A abreviação a ser usada em referências dos Anais da Academia Brasileira de Ciências é An Acad Bras Cienc. Os seguintes exemplos devem servir de guias para sua lista de referências em nossa revista:

## REFERENCES

ALBE-FESSARD D, CONDES-LARA M, SANDERSON P & LEVANTE A. 1984a. Tentative explanation of the special role played by the areas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

ALBE-FESSARD D, SANDERSON P, CONDES-LARA M, DELAND-SHEER E, GIUFFRIDA R & CESARO P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.

KNOWLES RG & MONCADA S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

PINTO ID & SANGUINETTI YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

*Livros e capítulos de livros*

DAVIES M. 1947. An outline of the development of Science. Thinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

PREHN RT. 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: NATIONAL CANCER CONFERENCE, 5., Philadelphia. Proceedings ... , Philadelphia: J. B. Lippincott, p. 97-104.

UYTENBOGAARDT W & BURKE EAJ. 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

WOODY RW. 1974. Studies of theoretical circular dichroism of polipeptides: contributions of B-turns. In: BLOUTS ER ET AL. (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.