



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

NADIELE TAISE MASSARANDUBA

**USO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS ASSOCIADA A CURATIVO BIOATIVO
DE QUITOSANA/XANTANA/ β -GLUCANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM COELHOS**

Presidente Prudente - SP
2024



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

NADIELE TAISE MASSARANDUBA

**USO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS ASSOCIADA A CURATIVO BIOATIVO
DE QUITOSANA/XANTANA/ β -GLUCANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM COELHOS**

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

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Cecília Laposy Santarém

Presidente Prudente - SP
2024

636.089
M414u

Massaranduba, Nadiele Taise.

Uso da fibrina rica em plaquetas associada a curativo bioativo de quitosana/xantana/ β -glucana na cicatrização de feridas experimentalmente induzidas em coelhos / Nadiele Taise Massaranduba. – Presidente Prudente, 2024.

41f.: il.

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

Bibliografia.

Orientador: Dra. Cecília Laposy Santarém.

1. Reparação tecidual. 2. Colagenização . 3. Biomateriais. 4. Biocurativos. I. Título.

Catálogo na fonte: Michele Mogni – CRB 8 - 6204

NADIELE TAISE MASSARANDUBA

**USO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS ASSOCIADA A CURATIVO BIOATIVO
DE QUITOSANA/XANTANA/ β -glucana NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM COELHOS**

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

Presidente Prudente, 28 de agosto de 2024.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, por me fortalecer todos os dias e me mostrar sempre o melhor caminho a seguir.

À minha família, ao meu namorado e aos meus amigos, que sempre me incentivaram a continuar meus estudos e são apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Cecília Laposy Santarém, pela oportunidade de ser sua orientada, pelas conversas e ensinamentos e por confiar em mim tamanha responsabilidade.

Agradeço à banca da qualificação e da defesa (Profa. Dra Rosa Maria Barilli Nogueira, Prof. Dr. Rodrigo Costa da Silva e Prof. Dr. Valter Dias da Silva), por terem aceitado o convite, por acompanharem meu desenvolvimento profissional e por serem fundamentais no processo de evolução desse trabalho.

Não menos importante, agradeço a todos que torceram por mim, que mandaram mensagens de apoio durante todo o caminho até aqui e a todos os professores e técnicos que tive a honra de conhecer e aprender durante esses dois anos de Mestrado.

Agradeço também a CAPES pelo fomento da pesquisa - “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001”.

*“O importante é não parar de questionar;
a curiosidade tem sua própria razão de existir.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

Uso da Fibrina Rica em Plaquetas associada a curativo bioativo de quitosana/xantana/ β -glucana na cicatrização de feridas experimentalmente induzidas em coelhos

A cicatrização de feridas é um campo dinâmico e em rápido crescimento no mercado mundial. Avanços na tecnologia resultaram no desenvolvimento de uma ampla gama de curativos para diferentes tipos de feridas visando as fases da cicatrização. O curativo ideal deve auxiliar em uma cicatrização mais eficiente, preservar a hidratação da pele, ser oxigênio permeável, não aderente e hipoalergênico, e fornecer uma barreira contra contaminantes a um custo razoável e com o mínimo de inconveniência para o paciente. Portanto, a escolha do melhor curativo deve ser baseada no que a ferida precisa e no que o curativo faz para alcançar a regeneração completa e restauração da estrutura e função da pele. Biopolímeros como quitosana, são amplamente utilizados no tratamento de feridas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e similaridade a macromoléculas reconhecidas. No entanto, a maioria das formulações baseadas em biopolímeros ainda apresentam vários problemas; assim, estratégias para combiná-los com biomateriais como fibrina rica em plaquetas autóloga (FRPa) representam o futuro da cicatrização de feridas. Foram utilizados 24 coelhos a fim de caracterizar as alterações macroscópicas de feridas experimentalmente induzidas e tratadas com fibrina rica em plaquetas autóloga com e sem curativo bioativo sobre os aspectos morfológicos associados ao processo cicatricial, nos dias 07,14,21 e 28. Conclui-se que a FRPa se mostrou mais promissora em relação ao tempo de cicatrização das feridas, entretanto, nas análises morfológicas o uso da membrana não proporcionou um efeito sinérgico quando associada ao biomaterial.

Palavras-chave: Reparação tecidual, colagenização, biomateriais, biocurativos.

ABSTRACT

The use of Platelet-Rich Fibrin associated with a bioactive dressing of chitosan/xanthan/ β -glucan in the healing of experimentally induced wounds in rabbits

The use of Platelet-Rich Fibrin associated with a bioactive dressing of chitosan/xanthan/ β -glucan in the healing of experimentally induced wounds in rabbits. Wound healing is a dynamic and rapidly growing field in the global market. Advances in technology have led to the development of a wide range of dressings for different types of wounds targeting the four phases of healing. The ideal dressing should promote rapid healing; preserve skin hydration; be oxygen-permeable, non-adherent, and hypoallergenic; and provide a barrier against contaminants - all at a reasonable cost and with minimal inconvenience to the patient. Therefore, the choice of the best dressing should be based on what the wound needs and what the dressing does to achieve complete regeneration and restoration of the skin structure and function. Biopolymers such as chitosan are widely used in wound treatment due to their biocompatibility, biodegradability, and similarity to recognized macromolecules. However, most biopolymer-based formulations still present several problems; thus, strategies to combine them with biomaterials like autologous Platelet-Rich Fibrin (PRF) represent the future of wound healing. Twenty-four rabbits were used to characterize the macroscopic changes in experimentally induced wounds treated with autologous platelet-rich fibrin with and without a bioactive dressing on morphological aspects associated with the healing process, on days 07, 14, 21, and 28. Thus, this study aimed to analyze the use of biomaterials with or without the bioactive dressing of chitosan complexed with xanthan and β -glucan in the healing of wounds induced in rabbits, characterizing the macroscopic and morphometric effects. It is concluded that aPRF proved to be more promising in relation to wound healing time, however, in morphological analyzes the use of the membrane did not provide a synergistic effect when associated with the biomaterial.

Keywords: Tissue repair, collagenization, biomaterials, biocuratives.

LISTA DE SIGLAS

Af	– Área final
Ai	– Área inicial
CAPES	– Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	– Comissão Ética no Uso de Animais
cm	– Centímetros
CPDI	– Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
FRP	– Fibrina Rica em Plaquetas
FRP-L	– Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos
GC	– Grupo Controle
GFRPa	– Grupo Fibrina Rica em Plaquetas autólogo
GFRPaM	– Grupo Fibrina Rica em Plaquetas autólogo e membrana
GM	– Grupo Membrana
HE	– Hematoxilina e Eosina
IM	– Intramuscular
Kg	– Kilograma
L	– Litro
M7	– Momento 7
M14	– Momento 14
M21	– Momento 21
M28	– Momento 28
Mg	– Miligramas
Min	– Minutos
mL	– Mililitros
mm	– Milímetros
°C	– Graus Celsius
Pc	– Porcentagem de contração
PRP	– Plasma rico em plaquetas
Q	– Quitosana
Rpm	– Rotações por minuto
SBCAL	– Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
UNOESTE	– Universidade do Oeste Paulista
X	– Xantana

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO.....	11
ANEXO A – APROVAÇÃO ÉTICA.....	35
ANEXO B – NORMAS DA REVISTA.....	36

ARTIGO CIENTÍFICO¹**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM COELHOS E TRATADAS COM FIBRINA RICA EM PLAQUETAS AUTÓLOGA E CURATIVO BIOATIVO DE QUITOSANA/XANTANA/ β -GLUCANA**

Nadiele Taise Massaranduba¹, Ana Karla Silva Almeida², Diego Osvaldo dos Santos¹, Marco Aurélio da Cruz Nobre Gomes¹, Thaoan Bruno Mariano¹, Valter Dias da Silva³, Marcia Zilioli Bellini³, Rosa Maria Barilli Nogueira¹, Cecília Laposy Santarém¹.

¹Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) – Presidente Prudente, SP, Brasil.

²Discente do curso de graduação de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) – Presidente Prudente, SP, Brasil.

³Docente do Centro Universitário de Adamantina (UNIFAI) – Adamantina, SP, Brasil.

Autor para correspondência: Cecília Laposy Santarém, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista. Rodovia Raposo Tavares, km 572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente – SP. CEP 19067-175. Telefone: (18) 99623-0772. E-mail: claposy@unoeste.br.

¹ Artigo científico formatado segundo normas da revista Anais da Academia Brasileira de Ciências. Fator de Impacto: 1,81

**MORFOLOGIA E MORFOMETRIA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM COELHOS E TRATADAS COM
FIBRINA RICA EM PLAQUETAS AUTÓLOGA E CURATIVO BIOATIVO DE
QUITOSANA/XANTANA/B-GLUCANA**

Nadiele Taise Massaranduba¹

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

Ana Karla Silva Almeida²

<http://orcid.org/0009-0005-8047-1623>

Diego Osvaldo dos Santos¹

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

Marco Aurélio da Cruz Nobre Gomes¹

<http://orcid.org/0009-0009-1550-0634>

Thaoan Bruno Mariano¹

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

Valter Dias da Silva³

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

Marcia Zilioli Bellini³

<https://orcid.org/0009-0002-7933-7938>

Rosa Maria Barilli Nogueira⁴

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

Cecília Laposy Santarém^{4*}

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

¹Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) – Presidente Prudente, SP, Brasil. Rodovia Raposo Tavares, km 572, Bairro Limoeiro. CEP 19067-175.

²Discente do Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) – Presidente Prudente, SP, Brasil. Rodovia Raposo Tavares, km 572, Bairro Limoeiro. CEP 19067-175.

³Docente do Centro Universitário de Adamantina (UNIFAI), Adamantina, SP, Brasil. Rua Nove de Julho, 730, Centro, Presidente Prudente – SP. CEP 17800-000.

⁴Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) – Presidente Prudente, SP, Brasil. Rodovia Raposo Tavares, km 572, Bairro Limoeiro. CEP 19067-175.

Key words: Biomaterial, lesão tecidual, cicatrização, colagenização

Running title: Eficácia da reparação tecidual com uso de biomateriais

Academy Section: Ciência Animal

Correspondence to: Cecília Laposy Santarém.

E-mail: claposy@unoeste.br

Telefone: (18) 99623-0772

Rodovia Raposo Tavares, km 572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

CEP 19067-175.

RESUMO

A cicatrização de feridas é um campo dinâmico e em rápido crescimento no mercado mundial. Avanços na tecnologia resultaram no desenvolvimento de uma ampla gama de curativos para diferentes tipos de feridas visando as quatro fases da cicatrização. Biopolímeros como quitosana, são amplamente utilizados no tratamento de feridas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e similaridade a macromoléculas reconhecidas. No entanto, a maioria das formulações baseadas em biopolímeros ainda apresentam vários problemas; assim, estratégias para combiná-los com biomateriais como Fibrina Rica em Plaquetas autóloga (FRPa) representam o futuro da cicatrização de feridas. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo analisar a utilização de biomateriais com ou sem o curativo bioativo de quitosana complexada com xantana e β -glucana na cicatrização de feridas induzidas em coelhos, caracterizando os efeitos macroscópicos e morfométricos. Foram utilizados 24 coelhos a fim de caracterizar as alterações macroscópicas de feridas experimentalmente induzidas e tratadas com fibrina rica em plaquetas autóloga com e sem curativo bioativo sobre os aspectos morfológicos associados ao processo cicatricial, nos dias 07, 14, 21 e 28. Conclui-se que a FRPa se mostrou mais promissora em relação ao tempo de cicatrização das feridas, entretanto, nas análises morfológicas o uso da membrana não proporcionou um efeito sinérgico quando associada ao biomaterial.

Palavras-chave: Reparação tecidual, colagenização, biomateriais, biocurativos

INTRODUÇÃO

O tecido cutâneo é o maior órgão do corpo, desempenhando um papel fundamental no funcionamento do organismo. A pele é composta pela epiderme e pela derme e são responsáveis dentre outras funções, por regular a temperatura corporal e proteger contra agentes externos, além da derme ser composta por uma camada de matriz extracelular, a qual dá suporte a diversos tipos celulares que, impulsionam a regeneração tecidual, seja ela fisiológica ou traumática (Adhikari et al. 2023). Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e são responsáveis por sintetizarem fibras do tecido conjuntivo, glicoproteínas da matriz extracelular (MEC) e o colágeno, sendo essenciais no processo de reparação e cicatrização tecidual (Mascharak & Longaker, 2020).

As feridas são sítios propícios para a proliferação bacteriana, o que gera inflamação, infecção, necrose e, nos casos mais complicados, pode levar até à morte. Dessa maneira, encontrar curativos que sejam capazes não só de reparar a lesão tecidual, mas também impedir que haja crescimento bacteriano e necrose celular é um desafio em termos de rotina médica. (Budiarso et al. 2023). A cicatrização das feridas engloba três fases que agem de formas sucessivas e interligadas, sendo elas a fase de inflamação, onde podemos encontrar diversos mediadores químicos e a presença de leucócitos; fase de proliferação, onde os fibroblastos se proliferam por meio da mediação de células mononucleares; e a fase de remodelação/maturação, na qual ocorre uma diminuição da atividade celular local (Bilgen et al. 2021).

Atualmente existem diversas opções comerciais utilizadas na cicatrização de feridas, porém, visando um melhor custo-benefício ao paciente, menores efeitos colaterais e mínimo risco ao meio ambiente, têm-se buscado alternativas biológicas e biodegradáveis para tal finalidade, os chamados biomateriais. Para ser considerado um bom biomaterial, é necessário

que sua estrutura química possa ser modificada de acordo com o uso em questão e que tenha biocompatibilidade com os órgãos/tecidos do organismo (Budiarmo et al. 2023).

Os biomateriais englobam diversos tipos de materiais que têm a capacidade de se fundirem de forma transitória ou permanente aos órgãos e tecidos do corpo, a fim de proporcionar sua regeneração. Além disso, os biopolímeros são biodegradáveis e biocompatíveis, sendo seu uso amplamente estudado na rotina biomédica (Dec et al. 2023).

Como exemplo de biomateriais, os compostos feitos a partir das plaquetas são essenciais no processo de cicatrização de feridas e seus fatores de crescimento auxiliam na reepitelização e neovascularização durante a fase de proliferação da cicatrização (Bilgen et al. 2021).

A Fibrina Rica em Plaquetas (FRP) é considerada uma nova geração dos concentrados de plaquetas, pois apresenta altas taxas de regeneração tecidual e sua polimerização lenta favorece a arquitetura fisiológica dos tecidos. Além disso, a presença dos fatores de crescimento e de citocinas são responsáveis por regular os processos inflamatórios e melhorar a angiogênese local, o que acelera as fases da cicatrização (Herrera-Vizcaíno et al. 2019). A presença de leucócitos na FRP-L (Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos), reduz as chances de infecções (Canellas et al. 2017; Castro et al. 2019).

A FRP é obtida a partir de uma única centrifugação do sangue, coletado em tubo sem a adição de anticoagulantes ou substâncias gelificantes, o que torna o processo mais vantajoso em relação ao preparo do PRP e ativa em poucos minutos as plaquetas e a cascata de coagulação e por resultar em um coágulo sólido rico em uma matriz plaquetária, libera fatores de crescimento por um período maior de tempo (Dohan et al. 2014; Varghese et al. 2017).

Como propostas terapêuticas alternativas, o emprego de curativos dérmicos desenvolvidos a partir de polissacarídeos naturais (quitina, quitosana, alginato, pectina, xantana, celulose e seus derivados: metilcelulose, carboximetilcelulose) isolados ou combinados por complexação (quitosana complexada com xantana), tem se mostrado promissor

nos processos de cicatrização de lesões graves da pele (Bellini et al. 2012; Bellini et al. 2015), pois oferecem um microambiente favorável, hidratado e com isolamento térmico, removendo o excesso de exsudato e promovendo as trocas gasosas (Jayakumar et al. 2011).

A quitosana, amplamente utilizada na reparação tecidual, é um biopolímero derivado da quitina, encontrada principalmente no exoesqueleto de crustáceos, alguns insetos e parede celular de fungos (Kumar et al. 2004). Seu uso tem se mostrado eficiente em processos biológicos como melhora na cicatrização, hemostasia, aumento da imunidade, adesão e atividade antimicrobiana (Ezoddini-Ardakani et al. 2011; Burkatovskaya et al. 2006). A goma Xantana é um produto da fermentação das cepas das bactérias gram-negativas *Xanthomonas campestris*, as quais são aeróbias estritas e se apresentam na forma de bastonetes móveis. Embora seja um produto derivado de um microrganismo, a lista Europeia de aditivos alimentares permitidos a classificou como aditivo não tóxico para os seres humanos e o *Food and Drug Administration*, dos Estados Unidos, declarou a goma xantana como segura para uso alimentar e farmacêutico, como estabilizantes e emulsificantes, não influenciando o desenvolvimento dos indivíduos (Dzionic et al. 2022).

Por sua vez, a β -glucana é um polissacarídeo encontrado em cereais, derivados de cevada e aveia e também na parede celular de alguns tipos de fungos, apresenta solubilidade em água e uma estrutura de ligação linear, a qual está relacionada com o estímulo do sistema imune. Estudos mostram sua eficácia na normalização dos níveis de colesterol e de glicose pós-prandial (Mio et al. 2020)

Algumas vantagens dos biopolímeros incluem a não toxicidade ambiental e a possibilidade de serem transformados enzimaticamente ou quimicamente em géis, filmes e nanopartículas, o que facilita a aplicabilidade de acordo com cada local e tipo de lesão (Qin & Li 2020).

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo analisar a utilização de biomateriais com ou sem o curativo bioativo de quitosana complexada com xantana e β -glucana na cicatrização de feridas induzidas em coelhos, caracterizando seus efeitos macroscópicos e morfométricos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 24 coelhos machos e fêmeas adultos, clinicamente saudáveis, da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), peso médio $3,0 \pm 1,0$ kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo (12 horas claro/escuro) controlados. Os coelhos passaram por um período de adaptação de sete dias antes do estudo. Durante todo o experimento foram mantidos em condições padronizadas de água à vontade e dieta com ração comercial (Fig. 1). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de origem (protocolo nº 6115), estando de acordo com as normas e princípios éticos estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals – National Research Council*.



Figura 1. Coelhário onde os animais foram mantidos durante todo o experimento.

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 $Z \sim N(0;1)$

s = desvio-padrão

e = erro padrão

O tamanho amostral obtido foi de 24 animais, sendo distribuídos em 06 animais cada grupo. O cálculo foi realizado considerando um nível de confiança de 99%. Em relação ao desvio-padrão, usou-se $s=0,0469$, considerando o desvio-padrão obtido em trabalho semelhante (Tetila et al. 2019).

Grupos de Pesquisa

Os 24 animais foram distribuídos de maneira aleatória em quatro grupos experimentais com seis animais cada: Grupo Controle (GC); Grupo Fibrina Rica em Plaquetas autóloga (GFRPa); Grupo Membrana (GM) e Grupo Fibrina Rica em Plaquetas autóloga e Membrana (GFRPaM) conforme ilustrado na Fig.2.

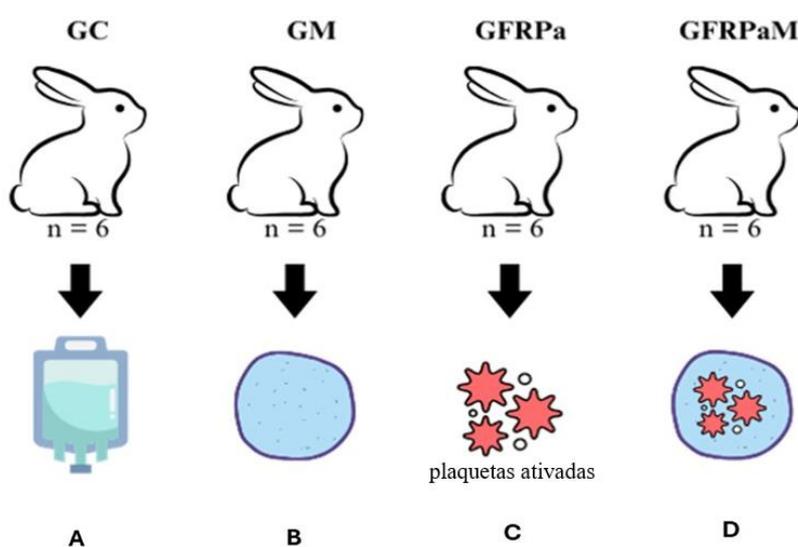


Figura 2. Esquema do delineamento experimental: A: Grupo Controle (GC); B: Grupo Membrana (GM); C: Grupo Fibrina Rica em Plaquetas autóloga (GFRPa) e D: Grupo Fibrina Rica em Plaquetas autóloga e Membrana (GFRPaM).

Procedimento anestésico

Os animais foram contidos manualmente para realização da tricotomia da região dorsal direita e esquerda. Em seguida, anestesiados (via intramuscular - IM) com uma associação de cloridrato de cetamina 100 mg/ml (40 mg/kg IM) e cloridrato de xilazina a 2% (5 mg/Kg IM), e, posteriormente, aplicado anestésico local (cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor) no local da lesão.

Indução das lesões

Com os animais anestesiados, a pele foi demarcada em quatro locais com auxílio de caneta preta e foi utilizado um punch de 8mm para realização das feridas cirúrgicas. Os fragmentos foram retirados com auxílio de uma pinça anatômica, preservando a musculatura. As lesões dos grupos controle (GC) e FRPa (GFRPa) receberam, respectivamente, solução fisiológica e FRPa e, em seguida, foram recobertas com rayon estéril e curativo adesivo (Band aid[®]). Para os grupos membrana (GM) e FRPa com membrana (FRPaM) as feridas foram tratadas, respectivamente, com membrana e FRPa + membrana. O tratamento com biomaterial e/ou solução fisiológica foi aplicado apenas uma única vez.

Após o procedimento cirúrgico e os diferentes tratamentos, os animais receberam analgésico cloridrato de tramadol, na dose de 0,5 mg/Kg, IM, 2 vezes ao dia, durante 3 dias consecutivos, a fim de minimizar o desconforto inicial. Em todos os momentos o procedimento foi fotografado com uma câmera de smartphone de 12 megapixels (iPhone 11, Apple[®]), à uma altura padronizada de 33,5 cm e as lesões foram mensuradas com paquímetro digital (Fig.6) (DC-60 Western[®]).

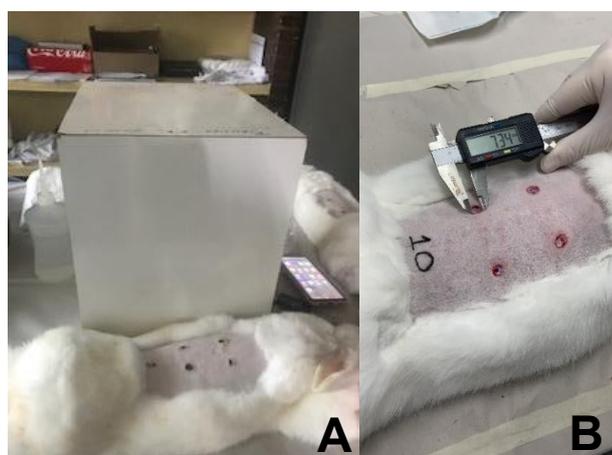


Figura 3. A: altura padronizada das imagens das lesões. B: Macroscopia das medições das lesões utilizando paquímetro digital.

Preparo da Fibrina Rica em Plaquetas autóloga (FRPa)

O sangue foi colhido da veia auricular de cada coelho (4 mL) utilizando um scalp 25G e acondicionado em tubos sem anticoagulante e passou por uma única centrifugação em baixa velocidade (200G - centrífuga Excelsa Baby 206R) durante 10 minutos. Esse procedimento ativa as plaquetas e a polimerização da fibrina (Narang et al. 2015). O coágulo de FRPa foi então retirado do tubo (Fig.4) e separado dos demais constituintes presentes, e estava pronto para ser colocado na área lesada (Camargo 2013).

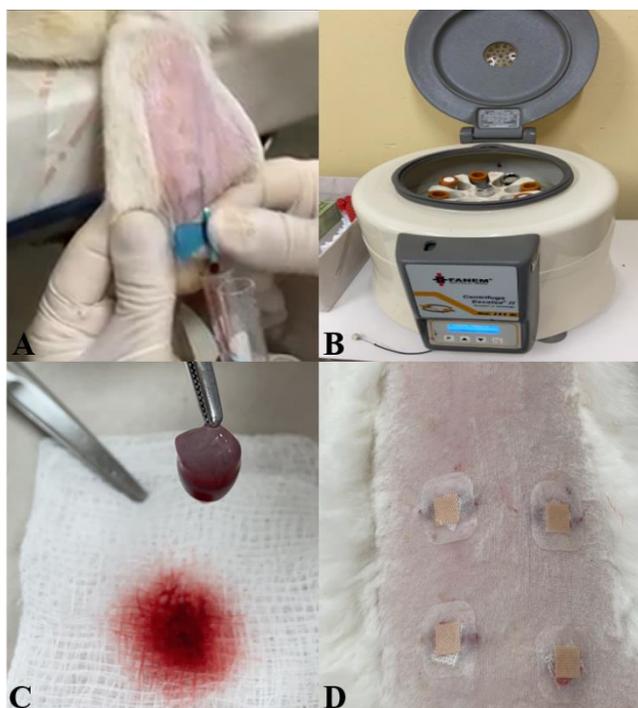


Figura 4. Preparo da FRPa: A: coleta do sangue pela veia auricular; B: centrifugação do material; C: FRPa pronta para uso; D: curativo após a aplicação da FRPa.

Preparo da Membrana de Quitosana complexada com Xantana e β -glucana

As membranas densas e porosas de quitosana (Q) complexadas com xantana (X) foram preparadas de acordo com os procedimentos descritos por Bellini et al. (2012), na razão de massa de X para Q igual a 1:1, usando 96% de quitosana desacetilada, goma xantana, Pluronic[®]

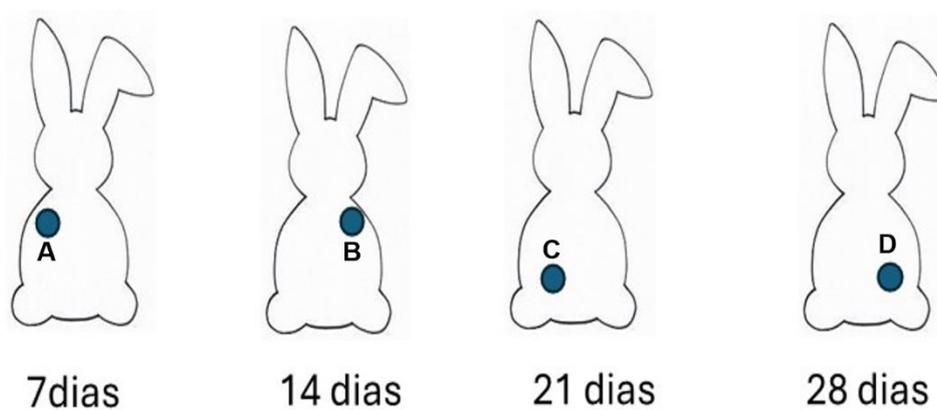
F-68 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) e ácido acético glacial (Merck; São Paulo, Brasil), com adição da β -glucana. Para a obtenção das membranas a solução de Q foi adicionada através de bomba peristáltica a uma vazão de 10 mL/min à solução de xantana e/ou de β -glucana, sob constante agitação de 1000 rpm através de agitador mecânico de alto torque. Nas formulações que continham tanto o polissacarídeo X quanto β -glucana, estes foram previamente misturados sob constante agitação de 1000 rpm por 2 minutos antes da adição da quitosana. Durante o preparo do complexo polimérico a temperatura foi mantida a 25°C em um reator de vidro encamisado com diâmetro interno de 11 cm e externo de 12 cm, de capacidade total igual a 7,5 L. Após a complexação polimérica, a suspensão de coacervados foi desaerada em bomba de vácuo por 2 horas, transferida para uma placa de poliestireno de 15 cm de diâmetro e seca em estufa com circulação de ar a 37°C até a formação de uma membrana seca. Ao término da secagem, para a neutralização do pH das membranas, as mesmas foram submetidas a sucessivas lavagens com água destilada e deionizada e com tampão Hepes a 10 mM e novamente secas em estufa de circulação de ar a 37°C, (Fig. 5).



Figura 5. Processamento da membrana. A: pesagem do material; B: diluição e homogeneização; C: preparo pronto; D: fracionamento em placas de Petri e secagem em estufa; E: membrana pronta para ser hidratada e utilizada nas lesões.

Análise macroscópica e morfométrica

Semanalmente os animais foram fotografados e as lesões mensuradas com auxílio de um paquímetro digital. As mensurações foram realizadas no dia 7 (ferida A), dia 14 (ferida B), dia 21 (ferida C) e dia 28 (ferida D), conforme evidencia esquema da fig. 6.



Esquema de avaliação macroscópica, morfométrica e biópsias das lesões

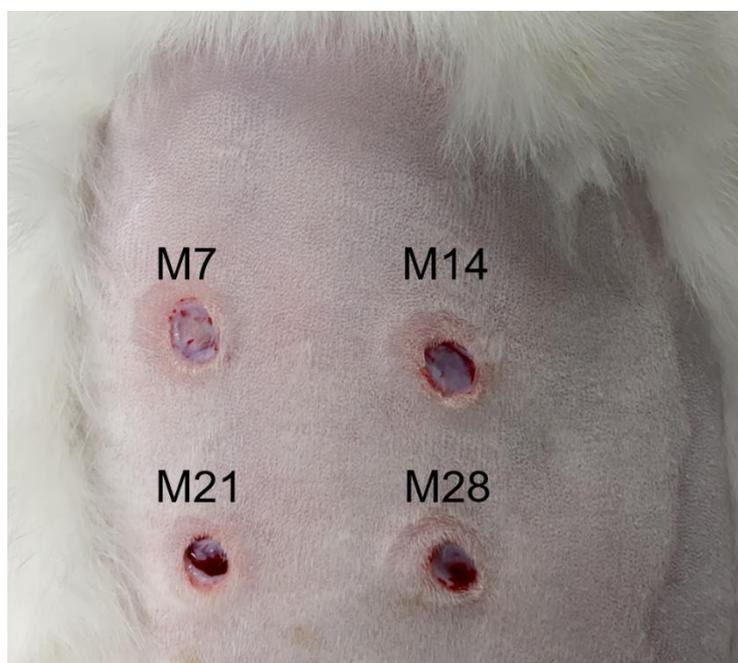


Figura 6. Fotografia das lesões experimentais (Punch 6mm) e respectivos momentos

Para a avaliação da morfologia das feridas, foram analisadas características como: cor e borda da ferida, presença de crosta, úlcera, necrose, exsudato na ferida e característica desse exsudato e edema (Quadro I).

A área da ferida foi mensurada com auxílio de paquímetro digital (DC-60 Western[®]) nos momentos acima citados e, em seguida, foi calculado o percentual de contração de cada lesão, utilizando o modelo matemático proposto por Agren et al. (1997) onde a porcentagem de contração (Pc) é igual a área inicial (Ai) menos a área final (Af) vezes 100 (x100), dividido pela área inicial (Ai), ou seja:

$$Pc = \frac{(Ai - Af) \times 100}{Ai}$$

Quadro I. Escores utilizados na análise morfológica e morfométrica das feridas induzidas experimentalmente e tratadas com diferentes biomateriais em coelhos.

Aspecto	Escore			
Cor da Ferida	1 – Rósea	2 – Amarelada	3 – Pálida	4 – Cianótica
Bordas	1 – Sem granulação		2 – Com granulação	
Crosta	1 – Sem crosta		2 – Com crosta	
Úlcera	1 – Sem úlcera		2 – Com úlcera	
Necrose	1 – Sem necrose		2 – Com necrose	
Exsudato	1 – Sem exsudato		2 – Com exsudato	

Característica	1 – Seroso	2 – Sanguinolento	3 – Purulento
exsudato			
Edema	1 – Sem edema	2 – Com edema	
S.A	Sem Avaliação		

Avaliação histopatológica

A avaliação histopatológica de cada ferida, foi realizada a partir da retirada de um fragmento do centro da lesão, nos momentos M7, M14, M21 e M28, com o auxílio de um punch de 6mm, foi realizado o mesmo protocolo anestésico utilizado no momento da indução das lesões. As amostras de pele foram fixadas em solução de formalina a 10% tamponada com pH 7,0 por 24 horas, e depois lavadas em água corrente por 1 hora. Após isso, os fragmentos foram transferidos para uma solução de álcool 70% para posterior processamento, conforme a técnica de rotina histológica para microscopia óptica e inclusão em parafina. Os cortes foram corados pelos métodos da hematoxilina e eosina (HE). A contagem de fibroblastos foi realizada através da leitura das lâminas em aumento de 400x, por meio da média somatória entre 10 campos, observados de cada animal (Fig. 7). Todas as avaliações foram feitas por um único observador e de forma cega (Vendramin et al. 2010).

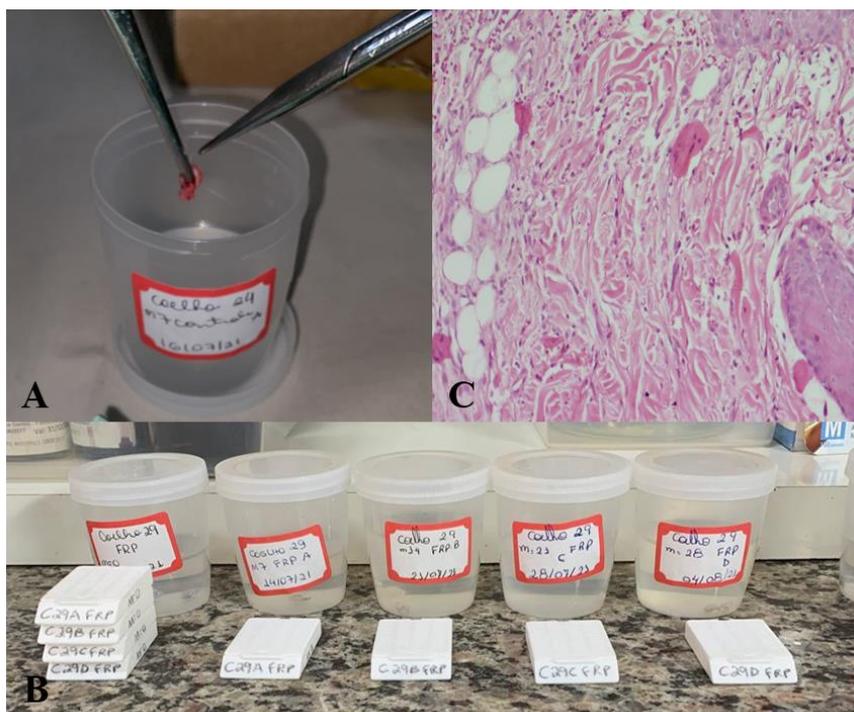


Figura 7. Avaliação histopatológica. A: retirada do fragmento para biópsia; B: emblocamento do material; C: fibroblastos em aumento de 400x.

Análise Estatística

As variáveis foram consideradas paramétricas e os momentos foram comparados dentro de cada grupo por análise de variância de medidas repetidas, com validação do pressuposto de esfericidade dos dados pelo teste de Mauchly's e contrastes pelo método de Tukey, com ajuste dos valores de significância pelo método de Bonferroni. Todas as análises foram conduzidas no Programa R com auxílio dos pacotes rstatix e PMCMRplus (Kassambara, 2023, Pohlert, 2023, R Core Team, 2024).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os aspectos macroscópicos e morfométricos demonstraram não haver diferença estatística em relação à coloração das feridas, que se mantiveram róseas em todos os grupos e momentos analisados. Além disso, também não houve presença de necrose, exsudato e edema

nos grupos descritos. As alterações observadas que apresentaram diferença estatística estão relatadas na tabela e figura a seguir (Tabela 1 e Fig.8).

Tabela 1. Alterações macroscópicas e morfométricas observadas durante o experimento com diferenças significativas.

Alteração observada	Grupo	% de animais	Momento
Borda com granulação	FRPa	50%	7
Úlcera na lesão	FRPa	16%	7
	Controle	100%	7
	Membrana	83%	7
	FRPa	50%	7
	FRPa + Membrana	100%	7
Crostas			

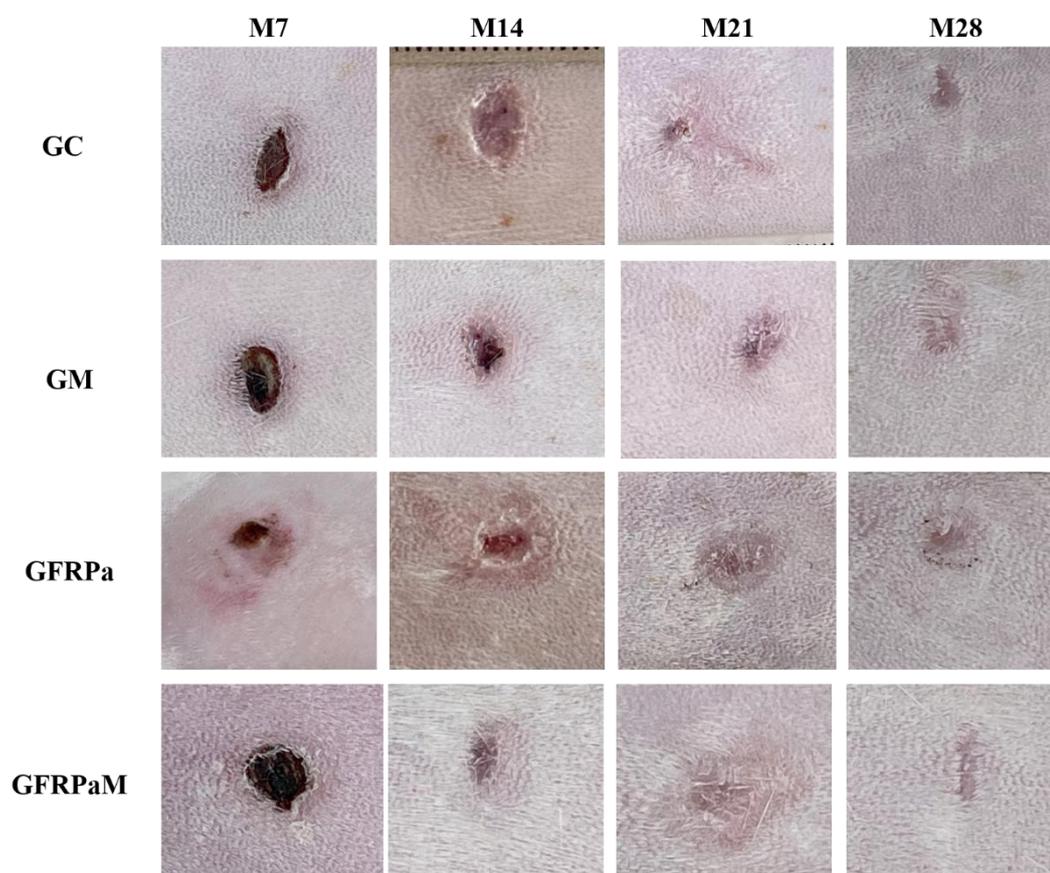


Figura 8. Macroscopia das lesões nos momentos 7, 14, 21 e 28 de feridas experimentalmente induzidas em coelhos.

Com relação à porcentagem de contração (Fig. 9), é possível notar que o GFRPa apresentou (82,25%), enquanto o GC apresentou (57,04%), GM (57,17%) e GFRPaM (61,65%), porém mesmo com o resultado obtido pelo GFRPa, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos e momentos ($p > 0,05$). Tal resultado pode ser explicado pelo fato que, durante as 24 primeiras horas, a liberação de citocinas e fatores de crescimento da FRP é maior, entretanto, a mesma pode durar até 21 dias pós lesão. Dessa maneira, funções como angiogênese, proliferação e modulação celular são estimuladas, assim como aumento na síntese de colágeno e recrutamento de fibroblastos, pois ao serem ativadas, as plaquetas liberam grânulos que desencadeiam diversos fatores de crescimento responsáveis por estimularem a angiogênese e a reepitelização, reparando o tecido lesionado (Kobayashi et al. 2016; Lourenço et al. 2018; Wang et al. 2018; Bai et al 2023).

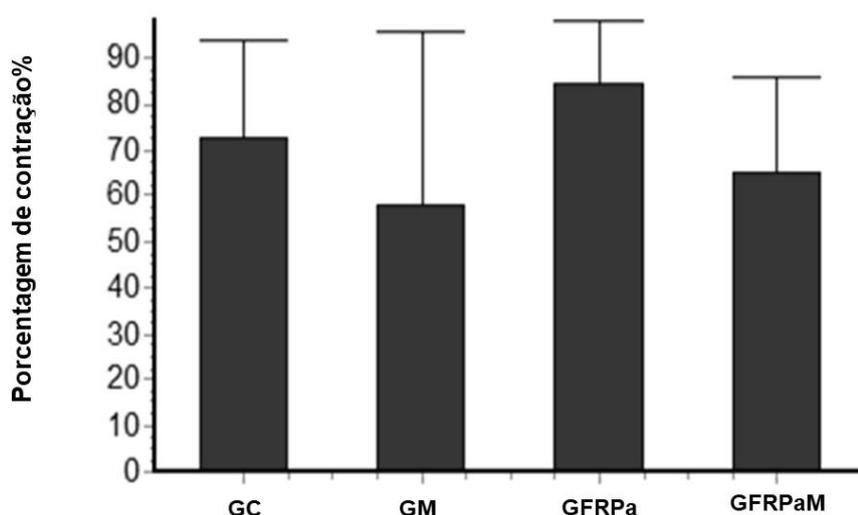


Figura 9. Porcentagem de contração das feridas nos diferentes tratamentos.

A contagem de fibroblastos não diferiu estatisticamente em relação aos tratamentos em si ($p>0,05$), mas houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os momentos dentro do mesmo tratamento, como é possível observar na Tabela 1. No grupo Controle houve uma diferença entre os dias 7, 14 e 21; no grupo Membrana entre os dias 7 e 14; FRPa entre os dias 7 e 21 e apenas o grupo Membrana + FRPa não apresentou diferença estatística entre seus momentos.

Segundo Sezgin et al. (2021), em seu experimento as feridas apresentaram uma reação inflamatória com presença de crostas no dia 10 e no dia 21 o número de células inflamatórias diminuiu, o que se assemelha ao presente estudo e pode ser explicado pelas etapas da fase de cicatrização, onde a quantidade de mediadores inflamatórios e fibroblastos diminui conforme o período de cicatrização da ferida.

Tabela 2. Média e desvio padrão de fibroblastos de coelhos tratados ou não com biocurativo e FRPa.

Grupos/dias	7	14	21	28
Controle	77,1±30,0 ^A	127,6±20,6 ^B	145,5±40,8 ^B	139,3±39,6 ^{AB}
Mb	158,6±62,9 ^A	196,8±50,9 ^B	164,5±73,9 ^{AB}	153,8±71,4 ^{AB}
FRPa	141,5±63,2 ^A	160,0±31,6 ^{AB}	180,3±39,1 ^B	156,8±49,6 ^{AB}
FRPa+Mb	140,1±43,4 ^A	152,1±23,7 ^A	159,1±51,5 ^A	157,0±37,2 ^A

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha: $p<0,05$. Mb: Membrana; FRPa: Fibrina rica em plaquetas autóloga; FRPa+Mb: Fibrina rica em plaquetas autóloga e membrana

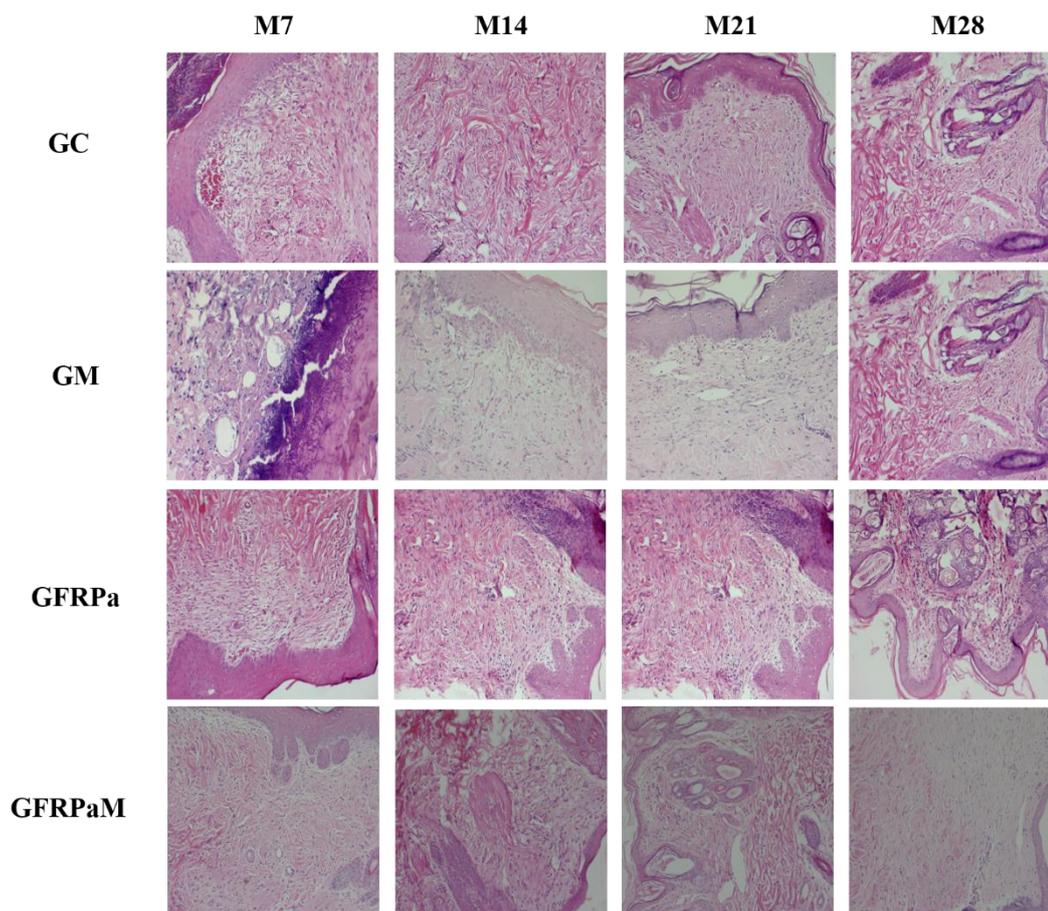


Figura 10. Contagem de fibroblastos em lâminas histológicas coradas com HE (aumento de 400x).

A FRP é amplamente utilizada em diversas áreas da saúde, como em procedimentos odontológicos, na dermatologia, ortopedia, cardiologia, oftalmologia e na cicatrização de feridas, devido aos seus fatores de crescimento que auxiliam na regeneração tecidual e na síntese de colágeno (Farmani et al. 2021). Outra característica importante da FRP é seu sinergismo com os leucócitos presentes no coágulo e que também secretam substâncias que estimulam a reparação tecidual (Karimi & Rockwell 2019).

A quitosana é o segundo polímero natural mais abundante que pode ser utilizado como biomaterial na área da saúde, apresentando alta solubilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, memória e termossensibilidade. O curativo à base de quitosana e colágeno desenvolvido por Zhang et al. (2018), foi capaz de inibir a proliferação bacteriana e manter uma

boa retenção de água no local da ferida, acelerando o processo de cicatrização. Em outro estudo, conduzido por Choudhary et al. (2020), foi observado que a união da quitosana com compostos de grafeno-prata permitiram um controle de hemorragias decorrentes de lesões profundas, aumentando a eficácia hemostática do biopolímero em até três vezes.

No estudo realizado por Sarkar et al. (2019), a quitosana na forma de hidrogel se mostrou um melhor agente hemostático em relação à FRP, nos casos de coagulação dos pacientes que faziam uso de medicamentos antiplaquetários e precisavam passar por procedimento cirúrgico. Entretanto, a FRP apresentou melhores propriedades cicatrizantes, corroborando os resultados observados nesse estudo. Segundo Cianca et al. (2020), as membranas com β -glucana em sua composição são menos espessas, apresentam menor capacidade de permeabilidade e menos resistência à tração.

Outro ponto observado sobre a adição de β -glucana na composição das membranas, foi que quanto maior a concentração desse biomaterial, maior a quantidade de bolhas formadas na superfície do biocurativo. Além disso, o custo da β -glucana purificada no país é elevado, tornando inviável uma maior adição desse componente na formulação dos curativos (Nakasse et al. 2020).

Os biomateriais foram desenvolvidos com o intuito de auxiliar na regeneração tecidual e cicatrização das feridas, pois dentre suas particularidades podemos citar ação hemostática, antimicrobiana e adesiva, além de adaptação mecânica (Adhikari et al. 2023). Tais propriedades foram observadas durante o desenvolvimento do presente trabalho, tanto com o uso da FRPa quanto da membrana.

Conclui-se que, mesmo não apresentando o efeito sinérgico esperado, os dois biomateriais, de forma isolada, se mostraram promissores em relação à cicatrização de feridas, já que o grupo FRPa apresentou uma maior porcentagem de contração em relação aos demais

e o grupo Membrana permitiu a produção constante de fibroblastos ao longo do tempo, o que pode favorecer o processo cicatricial.

AGRADECIMENTOS

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

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:

Contribuições científicas e intelectuais substanciais para o estudo: Santarém, CL; Nogueira, RMB, Bellini, MZ. **Concepção e projeto:** Santarém CL Nogueira, RMB, Silva, VD; **Aquisição de dados:** Massaranduba, NT, Santos, DO, Almeida, AK. **Análise e interpretação dos dados:** Massaranduba, ND. **Procedimentos técnicos:** Gomes, MACN. **Exames histopatológicos:** Gomes, MACN; **Análise estatística:** Mariano, TB. **Preparação do manuscrito:** Massaranduba, NT; **Redação do manuscrito:** Massaranduba, NT. **Revisão crítica:** Santarém, CL.

REFERÊNCIAS

ADHIKARI B, STAGER MA, KREBS, MD. Cell-instructive biomaterials in tissue engineering and regenerative medicine. 2023. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 111, n. 5, p. 660-681.

AGREN MS. et al. A comparative study of three occlusive dressing in the treatment of full-thickness wounds in pigs. 1997. *J Am Acad Dermatol*, v. 36, n. 1, p. 53-58.

BAI L. et al. Impact of a Novel Hydrogel with Injectable Platelet-Rich Fibrin in Diabetic Wound Healing. 2023. *J Diabetes Res*. 2023(1), 7532637.

BELLINI MZ. et al. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. 2012. *J Appl Polym Sci*, v. 125, n. S2, p. E421–E431.

BELLINI MZ, OLIVA-NETO P, MORAES AM. Properties of films obtained from biopolymers of different origins for skin lesions therapy. 2015. *Braz Arch Biol Technol*, v. 58, n. 2, p. 289–299.

BILGEN F. et al. Platelet-rich fibrin: An effective chronic wound healing accelerator. 2021. *J Tissue Viability*, v. 30, n. 4, p. 616-620.

BUDIARSO IJ. et al. Chitosan-based smart biomaterials for biomedical applications: Progress and perspectives. 2023. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, v. 9, n. 6, p. 3084-3115.

BURKATOVSKAYA M. et al. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. 2006, *Biomater*, v. 27, n. 22, p. 4157-4164.

CAMARGO FF. Efeito do plasma rico em plaquetas e da fibrina rica em plaquetas na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. 2013. 184 f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica, Rio Grande do Sul.

CANELLAS JV, RITTO FG, MEDEIROS PJ. Evaluation of postoperative complications after mandibular third molar surgery with the use of platelet-rich fibrin: a systematic review and meta-analysis. 2017. *Int J Oral Maxillofac Surg*. v. 46, n. 9, p. 1138-1146.

CASTRO AB. et al. Antimicrobial capacity of Leucocyte-and Platelet Rich Fibrin against periodontal pathogens. 2019. *Sci Rep*. v. 9, n. 1, p. 1-8.

CHOUDHARY P. et al. Fabrication of Chitosan-Reinforced Multifunctional Graphene Nanocomposite as Antibacterial Scaffolds for Hemorrhage Control and Wound-Healing Application. 2020. *ACS Biomater. Sci. Eng*, 6, 5911–5929.

CIANCA LPA. et al. Caracterização físico-química de biocurativos dérmico-epidérmicos de Quitosana, Xantana e Beta-Glucana. 2020. *Braz. J. Health Rev*. v. 3, n. 3, p. 5631-5650.

DEC P. et al. Existing and novel biomaterials for bone tissue engineering. 2022. *Int J Mol Sci*. 24(1), 529.

DOHAN DM. et al. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. 2014. *M.L.T.J*, v. 4, n. 1, p. 3-9.

DZIOŃEK A, WOJCIESZYŃSKA D, GUZIK, U. Use of xanthan gum for whole cell immobilization and its impact in bioremediation-a review. 2022. *Bioresour. Technol*. v. 351, p. 126918.

EZODDINI-ARDAKANI F. et al. Effects of chitosan on dental bone repair. 2011. *Health*, v. 3, n. 04, p. 200.

FARMANI AR et al. Application of platelet rich fibrin in tissue engineering: focus on bone regeneration. 2021. *Platelets*, v. 32, n. 2, p. 183-188.

HERRERA-VIZCAÍNO C. et al. Platelet-rich fibrin secretome induces three dimensional angiogenic activation in vitro. 2019. *Eur Cell Mater*, v. 37, p. 250-264.

JAYAKUMAR R. et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. 2011. *Biotechnol Adv*. v. 29, n. 3, p. 322–37.

KARIMI K & ROCKWELL H. The benefits of platelet-rich fibrin. 2019. *Facial Plastic Surgery Clinics*, v. 27, n. 3, p. 331-340.

KASSAMBARA A. *_rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests_*. 2023. R package version 0.7.2.

KOBAYASHI E. et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. 2016. *Clin Oral Investing*. v. 20, n. 9, p. 2353-2360.

KUMAR MR. et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. 2004. *Chem Rev*. v. 104, n. 12, p. 6017-6084.

LOURENÇO ES. et al. The in vitro release of cytokines and growth factors from fibrin membranes produced through horizontal centrifugation. 2018. *J Biomed Mater Res Part A*, v. 106, n. 5, p. 1373-1380.

MASCHARAK S & LONGAKER, MT. Fibroblast heterogeneity in wound healing: hurdles to clinical translation. 2020. *Trends. Mol. Med.* 26(12), 1101-1106.

MIO K. Effects of Beta-Glucan Rich Barley Flour on Glucose and Lipid Metabolism in the Ileum, Liver, and Adipose Tissues of High-Fat Diet Induced-Obesity Model Male Mice Analyzed by DNA Microarray. 2020. *Nutrients*. 12, 3546.

NAI GA. et al. Action of ascorbic acid on the healing of malnourished rats' skin wounds. *Revista de Nutrição*. 2014; 27(4), 459-472.

NAKASSE TSL. et al. Padronização da produção de biocurativos Dérmico-Epidérmicos de Quitosana, Xantana e Beta-Glucana. 2020. *Braz. J. Health Ver.* 3(3), 5496-5506.

NARANG I, MITTAL N, MISHRA N. A comparative evaluation of the blood clot, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin in regeneration of necrotic immature permanent teeth: A clinical study. 2015. *Contemp Clin Dent*, v. 6, n. 1, p. 63-68.

POHLERT T. *_PMCMRplus: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums Extended_*. 2023. R package version 1.9.10.

QIN Y, LI P. Antimicrobial chitosan conjugates: Current synthetic strategies and potential applications. 2020. *Int J Mol Sci*, v. 21, n. 2, p. 499.

R CORE TEAM. *R: A Language and Environment for Statistical Computing_*. 2024. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

SANTOS L. et al. Influence of polymeric assistive on the mechanical properties of a-tricalcium phosphate cement. 1999. *Bone*, v. 25; p. 99-102.

SARKAR S. et al. Efficacy of platelet rich fibrin versus chitosan as a hemostatic agent following dental extraction in patients on antiplatelet therapy. 2019. *J Oral Biol Craniofac Res*, v. 9, n. 4, p. 336-339.

SEZGIN B. et al. The effects of oral mucosa-derived heterotopic fibroblasts on cutaneous wound healing. 2021. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 74(10), 2751-2758.

VARGHESE MP, MANUEL S, KUMAR LK. Potential for osseous regeneration of platelet-rich fibrin - A comparative study in mandibular third molar impaction sockets. 2017. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 75, n. 7, p. 1322-1329.

WANG X. et al. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. 2018. *Platelets*, v. 29, n. 1, p. 48-55.

WILLIAMS DF. Dictionary of biomaterials. 1999. Liverpool: Liverpool University Press p.42.

ZHANG W. et al. Injectable and Body Temperature Sensitive Hydrogels Based on Chitosan and Hyaluronic Acid for pH Sensitive Drug Release. 2018. *Carbohydr. Polym.* 186, 82–90.

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 "USO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS ASSOCIADA A CURATIVO BIOATIVO DE QUITOSANA/XANTANA/B-GLICANA NA CICATRIZAÇÃO EM FERIDAS EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM COELHOS", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 7952 e tendo como participante(s) NADIELE TAISE MASSARANDUBA (discente), ANA KARLA SILVA ALMEIDA (discente), ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (docente), GISELE ALBORGHETTI NAI (docente), CECILIA LAPOSY SANTAREM (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 12/04/2023.

MATERIAL ARMAZENADO/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
6115	06/05/2020	UNOESTE	SIM	Laboratório de patologia -Campus 1

Presidente Prudente, 19 de Abril de 2023.

Prof. Doutor Rodrigo Garcia Jr.
 Docente Responsável pela CPDI

Prof. Dr. Felipe Rydziger de Raediger
 Coordenador da CEUA - UNOESTE

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). 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 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.

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.