



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

ANA ROSA VIEIRA DE FARIA

**ASSOCIAÇÃO DO BIOCURATIVO E FIBRINA RICA EM PLAQUETAS
FAVORECE A COLAGENIZAÇÃO DE FERIDAS EXPERIMENTAIS EM COELHOS**

Presidente Prudente - SP
2025



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

ANA ROSA VIEIRA DE FARIA

**ASSOCIAÇÃO DO BIOCURATIVO E FIBRINA RICA EM PLAQUETAS
FAVORECE A COLAGENIZAÇÃO DE FERIDAS EXPERIMENTAIS EM COELHOS**

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

Orientador:
Profa. Dra. Cecília Laposy Santarém

636.089
F224a

Faria, Ana Rosa Vieira de.

Associação do biocurativo e fibrina rica em plaquetas favorece a colagenização de feridas experimentais em coelhos / Ana Rosa Vieira de Faria. – Presidente Prudente, 2025.

34f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2025.

Bibliografia.

Orientador: Cecília Laposy Santarém

1. Distúrbios de cicatrização. 2. Colágeno. 3. Biocurativos . I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: “ASSOCIAÇÃO DO BIOCURATIVO E FIBRINA RICA EM PLAQUETAS
FAVORECE A COLAGENIZAÇÃO DE FERIDAS EXPERIMENTAIS EM COELHOS”**

AUTOR(A): ANA ROSA VIEIRA DE FARIA

ORIENTADOR(A): Profa. Dra. CECÍLIA LAPOSY SANTARÉM

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE(A) em
CIÊNCIA ANIMAL

Área de Concentração FISIOPATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

CECÍLIA LAPOSY SANTARÉM (orientadora)

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

KARINA MARIA BASSO

UNIFIL - Centro Universitário Filadélfia / Londrina (PR)

Data da realização: Presidente Prudente, 13 de Maio de 2025.

Central de Assinaturas Eletrônicas

Sobre o documento

Assunto: Documento eletrônico
Status do documento: Concluído
Data de criação do documento: 13/05/2025 11:05
Fuso horário: (UTC-03:00) Brasília
Número de assinaturas: 3
Solicitante: KEID RIBEIRO KRUGER (#6125259)

Signatários do documento

CECILIA LAPOSY SANTAREM (PROFESSOR)

clapasy@unoeste.br

Recebido em 13/05/2025 11:05

Assinado em 13/05/2025 12:00

Assinatura Interna UNOESTE

Usando endereço IP: 2804:18:1072:25ea:fd63:7e55:4b2a:bdb3

ID da assinatura: 4830584

ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (COORDENADOR DE CURSO)

rosa@unoeste.br

Recebido em 13/05/2025 11:05

Assinado em 13/05/2025 14:15

Assinatura Interna UNOESTE

Usando endereço IP: 177.131.33.2

ID da assinatura: 4830585

KARINA MARIA BASSO DE OLIVEIRA (SIGNATÁRIO EXTERNO)

karinavet.basso@gmail.com

Recebido em 13/05/2025 11:05

Assinado em 13/05/2025 16:54

Assinatura Interna UNOESTE

Usando endereço IP: 177.220.188.129

ID da assinatura: 4830586

URL do documento: <https://www.unoeste.br/ca/d0143088>

Assinatura digital do documento: 3a8ca8d18c8ba677d7cc08b26da967f8024d260c8a2c14e7406cb2dbea901d

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

Mantida pela Associação Prudentina de Educação e Cultura - APEC

Utilize o QRCode abaixo para conferir a autenticidade deste documento:



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pela força, sabedoria e vitórias em cada passo desde o início dessa jornada. Aos meus familiares, pelo amor incondicional, apoio e incentivo, fundamentais para alçar meu objetivo e aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse projeto.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por sua infinita paciência, amor e sabedoria. Sem a Tua presença e direção, este caminho seria impossível. Nossa Senhora Aparecida, mãe amorosa e minha intercessora, foi sob sua proteção que encontrei forças para superar os desafios e sabedoria para seguir adiante nos momentos de incerteza e fraquezas.

Agradeço a toda minha família, meu porto seguro, pelo amor incondicional e apoio em cada passo dessa jornada. Ao meu marido Mário Sérgio, pela paciência, compreensão e parceria ao longo desse percurso. As minhas filhas, Nathália, Beatriz e meu neto Joaquim por ser fonte constante de minha alegria, inspiração e motivação. Aos meus pais Benedito e Maria Lúcia que me ensinaram a jamais desistir e superar todos os obstáculos com perseverança e amor ao próximo. Minha sogra Eliza sempre me inspirou a estudar e buscar conhecimento e crescimento pessoal e profissional.

E com muito carinho meus agradecimentos, em especial a minha orientadora e professora Cecília, que foi imprescindível nessa jornada, que desde o início esteve disposta a me ajudar, contribuindo com o meu crescimento pessoal e profissional. O meu sincero agradecimento por cada palavra, por cada bronca, por compartilhar seus ensinamentos e por jamais desistir de mim. Sua presença nessa caminhada foi fundamental para trilharmos essa vitória. Meu muitíssimo obrigado.

“Não devemos chamar o povo à escola para receber instruções, postulados, receitas, ameaças, repreensões e punições, mas para participar coletivamente da construção de um saber, que vai além do saber de pura experiência feita, que leve em conta as suas necessidades e o torne instrumento de luta, possibilitando-lhe ser sujeito de sua própria história”. (Paulo Freire)

RESUMO

Associação do biocurativo e fibrina rica em plaquetas favorece a colagenização de feridas experimentais em coelhos

Os tecidos dérmicos, essenciais para a integridade da pele, são formados principalmente por colágeno, uma proteína vital que desempenha um papel crucial no processo de cicatrização de feridas. À medida que a pele se regenera, a quantidade, organização e tipo de colágeno se alteram, influenciando diretamente a força da pele cicatrizada. Em busca de soluções mais eficientes para a cicatrização de feridas graves, os biocurativos feitos de polissacarídeos naturais estão ganhando destaque como alternativas promissoras. Entre esses materiais, a quitosana, um polissacarídeo obtido da quitina, se destaca por sua semelhança estrutural com componentes do tecido dérmico. Sua capacidade de acelerar a cicatrização é notável, já que estimula a expressão de genes ligados à formação de vasos sanguíneos e à deposição de colágeno. Além disso, a quitosana atua de maneira ampla no processo de cura: promove a coagulação da ferida, minimiza a inflamação e incentiva a proliferação de fibroblastos, células essenciais para a regeneração tecidual. Objetivou-se nesse estudo caracterizar a eficácia da combinação de biocurativos com fibrina rica em plaquetas autólogas na regeneração de feridas dérmicas durante 21 dias de tratamento, utilizando a análise fractal do colágeno como uma medida quantitativa da estrutura. Foram utilizadas biópsias de pele de 18 coelhos coradas pelo método do Picrosírius e submetidas a leitura microscópica. A dimensão fractal foi estimada pelo método—box-counting por meio do software ImageJ. Observou-se uma organização significativa na produção de colágeno, evidenciada por uma menor densidade de fibras colágenas e um padrão morfológico regular. Conclui-se que a combinação da membrana com FRPa pode ser uma estratégia eficaz para otimizar a cicatrização de feridas, destacando-se como uma alternativa promissora no contexto da regeneração tecidual. Estudos futuros podem explorar diferentes formulações e tempos de aplicação para maximizar a eficácia deste tratamento.

Palavras-chave: Distúrbios de cicatrização, colágeno, biocurativos, regeneração de feridas.

ABSTRACT

Association of biocurative and platelet-rich fibrin favors the collagenization of experimental wounds in rabbits

Dermal tissues, which are essential for the integrity of the skin, are mainly composed of collagen, a vital protein that plays a crucial role in the wound healing process. As the skin regenerates, the quantity, organization and type of collagen change, directly influencing the strength of the healed skin. In the search for more efficient solutions for the healing of serious wounds, biodressings made from natural polysaccharides are gaining prominence as promising alternatives. Among these materials, chitosan, a polysaccharide obtained from chitin, stands out for its structural similarity to components of dermal tissue. Its ability to accelerate healing is remarkable, as it stimulates the expression of genes linked to the formation of blood vessels and the deposition of collagen. In addition, chitosan acts broadly in the healing process: it promotes wound coagulation, minimizes inflammation and encourages the proliferation of fibroblasts, cells essential for tissue regeneration. The aim of this study was to characterize the efficacy of the combination of biodressings with autologous platelet-rich fibrin in the regeneration of dermal wounds during 21 days of treatment, using fractal analysis of collagen as a quantitative measure of the structure. Skin biopsies from 18 rabbits were stained by the Picrosirius method and subjected to microscopic reading. The fractal dimension was estimated by the box-counting method using ImageJ software. A significant organization in collagen production was observed, evidenced by a lower density of collagen fibers and a regular morphological pattern. It is concluded that the combination of the membrane with FRPa can be an effective strategy to optimize wound healing, standing out as a promising alternative in the context of tissue regeneration. Future studies can explore different formulations and application times to maximize the efficacy of this treatment.

Keywords: Healing disorders, collagen, biodressings, wound regeneration.

LISTA DE SIGLAS

%	Porcentagem
ANOVA	– Análise de Variância
C	– Controle
°C	– Graus Celsius
CEUA	– Comissão de Ética do Uso de Animais
cm	– Centímetro
DF	– Dimensão Fractal
FRPa	– Fibrina Rica em Plaquetas Autóloga
GFRPa	– Grupo Fibrina Rica em Plaquetas autóloga
GM	– Grupo Membrana
IM	– Intramuscular
kg	– Quilograma
mg	– Miligrama
min	– Minutos
mL	– Mililitro
mm	– Milímetro
INS	– Instituto Nacional em Saúde
Q	– Quitosana
rpm	– Rotação por minuto
SBCAL	– Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
TM	– Tricômio de Masson
X	– Xantana

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	11
	ANEXO A – APROVAÇÃO ÉTICA.....	25
	ANEXO B – NORMAS DA REVISTA VETERINARY MEDICINE AND SCIENCE.....	26

1 ARTIGO CIENTÍFICO

Atuação do biocurativo e fibrina rica em plaquetas favorece a colagenização de feridas experimentais em coelhos

Ana Rosa Vieira de Faria¹ | Carla Lima Zavatieri² | Gisele Alborghetti Nai³ | Rosa Maria Barilli Nogueira³ | Cecília Laposy Santarém³

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

² Discente do Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

³ Docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

E-mail: Cecília Laposy Santarém (claposy@unoeste.br)

Financiamento: Os autores não receberam financiamento específico para este trabalho.

Palavras-chave: Colágeno; Cicatrização de Feridas; Biocurativos; Fibrina Rica em Plaquetas; Distúrbios de cicatrização.

RESUMO

Introdução: O colágeno, componente essencial para a integridade da pele, desempenha um papel crítico na cicatrização de feridas. Os biocurativos, especialmente aqueles feitos de polissacarídeos naturais como a quitosana, vêm sendo estudados como uma opção promissora para a cicatrização de lesões de pele graves.

Objetivos: Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da combinação de biocurativo e fibrina rica em plaquetas autóloga (FRPa) na cicatrização de feridas dérmicas em coelhos, utilizando a análise fractal do colágeno como medida quantitativa.

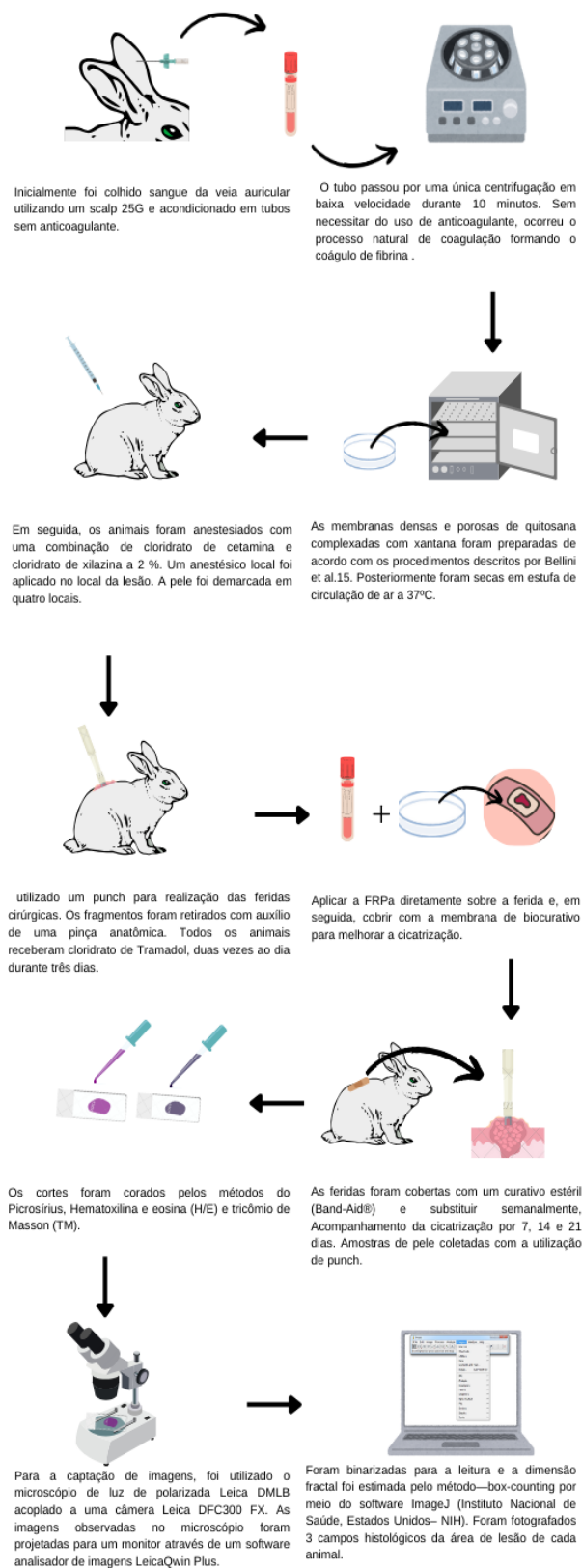
Métodos: Foram realizadas biópsias de pele em 24 coelhos, tratadas com diferentes combinações de biocurativo e FRPa. As amostras foram coradas pelo método Picrosírius e analisadas com o software ImageJ para a estimativa da dimensão fractal das fibras de colágeno, quantificando a organização e densidade das fibras colágenas.

Resultados: Observou-se uma organização significativa nas fibras colágenas dos grupos tratados com a combinação de FRPa e biocurativo (DF=1,82), com padrões morfológicos regulares e maior densidade de fibras em comparação aos grupos membrana (DF=1,91) e FRPa (DF=1,87). Esses resultados indicam uma melhora na regeneração tecidual e potencial uso clínico futuro.

Conclusão: A associação de biocurativo com FRPa mostrou-se promissora na cicatrização de feridas dérmicas, destacando-se como uma estratégia eficaz para otimizar a regeneração tecidual. Conclusão: A associação de biocurativo com FRPa mostrou-se promissora na cicatrização de feridas dérmicas,

destacando-se como uma estratégia eficaz para otimizar a regeneração tecidual.

Resumo gráfico:



1.Introdução

Distúrbios na cicatrização de feridas, incluindo a formação de cicatrizes e falhas na regeneração, são problemas comuns após lesões na pele, impactando a saúde física e psicológica dos pacientes (Fayne et al., 2020). Os tecidos dérmicos são compostos majoritariamente por colágeno e células, onde o colágeno desempenha um papel crucial como suporte estrutural e ambiente propício à sobrevivência celular, promovendo a regeneração tecidual (Ragini et al., 2020).

O processo de cicatrização de feridas é um mecanismo complexo que leva ao reparo da pele lesada. As fases da cicatrização determinam o tipo de curativo a ser utilizado para o uso adequado e manejo da ferida. O processo de cicatrização de feridas é composto por quatro fases sequenciais que podem se sobrepor: hemostasia, inflamação, proliferação e fase de remodelamento (Tiffany; Barr, 2020).

Apesar dos avanços, ainda não há um tratamento ideal para distúrbios na cicatrização, sendo necessário esclarecer melhor os mecanismos envolvidos. Os biocurativos têm emergido como soluções promissoras devido às suas propriedades bioativas, especialmente aqueles compostos por biopolímeros naturais como a quitina e a quitosana (Li et al., 2020).

De forma geral, a quitosana contribui com a cicatrização da ferida por promover a hemostasia da ferida, aumento da adesão e agregação plaquetária; além de reduzir a resposta inflamatória, melhorando a proliferação endotelial vascular e aumentando a expressão de fatores de crescimento e produção de citocinas (Taghipour et al., 2020; Mawazi et al., 2024).

A dimensão fractal está relacionada à complexidade das formas e pesquisas mostraram que este conceito também poderia descrever a complexidade morfológica de células e tecidos (Zumarán et al., 2018). A maioria desses procedimentos para identificação automatizada de lesões na pele em imagens dermatoscópicas inclui as seguintes fases: preparação da imagem, separação, identificação das características e classificação. Essas pesquisas desenvolveram um algoritmo de aprendizado profundo que permite identificar e classificar irregularidades por meio de box-counting (Moldovanu et al., 2021).

A dimensão fractal foi implementada como uma ferramenta eficaz para quantificar padrões complexos em formas aparentemente irregulares na natureza. Sua aplicação tornou-se um recurso poderoso na investigação e compreensão das estruturas intrincadas do corpo humano, facilitando a análise detalhada de seus sistemas e revelando novas camadas (Buruianã et al., 2024).

Sendo assim, a hipótese deste estudo é que a análise da dimensão fractal possa contribuir de uma maior precisão no diagnóstico da alteração dermatológica ocasionadas por lesões de pele, pode ser um método útil e para avaliação fisiopatológica. Espera-se que essa integração contribua para uma análise mais precisa, gerando benefícios sociais, econômicos e de saúde para os pacientes.

2. Material e Métodos

2.1 Animais e Condições Experimentais

Foram utilizados 18 coelhos adultos, machos e fêmeas, clinicamente saudáveis, da raça Nova Zelândia, com peso médio de $3,0 \pm 1,0$ kg. Os animais foram alojados em gaiolas individuais, com temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. O período de adaptação antes do experimento foi de sete dias, e durante o estudo, os coelhos tiveram acesso à dieta e água *ad libitum*.(fig.1)

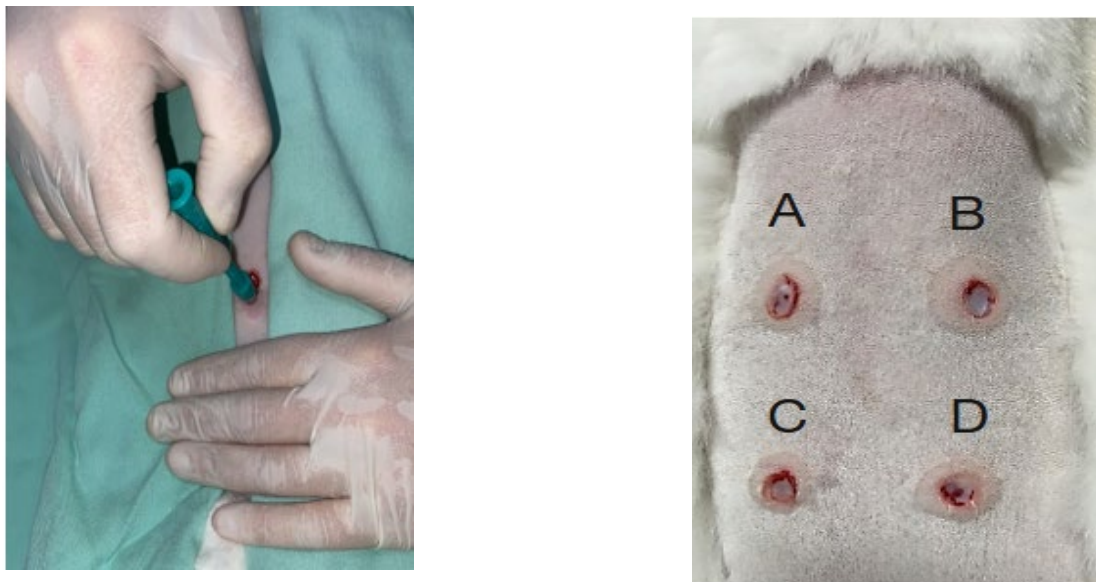


Figura 1.: Coelhoário da Unoeste. Animais alocados individualmente em gaiolas de contenção.

2.2 Procedimento Anestésico e Indução de Lesões

Para os procedimentos, foi realizada a tricotomia da região dorsal. Os animais foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de cetamina a 100 mg/ml (40 mg/kg, IM) e cloridrato de xilazina a 2% (5 mg/kg, IM).

Anestésico local (cloridrato de lidocaína 2%) foi aplicado na região de indução das lesões. Com os animais sob anestesia, quatro áreas da pele foram marcadas, e feridas cirúrgicas de 8 mm foram realizadas com um punch, preservando a musculatura. Após o procedimento, os coelhos receberam cloridrato de tramadol (0,5 mg/kg, IM), duas vezes ao dia, durante três dias



consecutivos, para minimizar o desconforto pós-operatório (fig.2)

Figura 2.: A: Indução das lesões com Punch 8mm. B: Lesões realizadas e identificados os momentos (A-7dias,B-14 dias,C-21 dias ,D-28 dias).

2.3 Preparação dos Tratamentos

Quatro feridas circulares foram criadas em cada animal usando um punch de 8 mm de diâmetro. As lesões receberam tratamento específico de acordo com os grupos experimentais definidos: o Grupo Fibrina Rica em Plaquetas Autóloga (GFRPa) recebeu aplicação de FRPa, coberta com rayon estéril e curativo adesivo; o Grupo Membrana (GM) recebeu solução salina e uma membrana de biocurativo composta por quitosana e xantana; e o Grupo FRPa + Membrana (FRPaGM) recebeu FRPa em combinação com a membrana de quitosana e xantana. Os tratamentos foram aplicados uma única vez, e os curativos foram trocados semanalmente.

2.4 Preparação da Fibrina Rica em Plaquetas Autóloga (FRPa) e Membrana de Quitosana e Xantana

O sangue foi coletado da veia auricular (4 mL) usando scalp 25G, sem anticoagulante, e centrifugado a 200G por 10 minutos, o que promoveu a

ativação das plaquetas e a polimerização da fibrina (Narang et al., 2015). Esse processo natural de coagulação formou o coágulo de fibrina, que foi separado e pronto para aplicação na área lesada (Azevedo, 2014; Camargo, 2013). Fig 3.

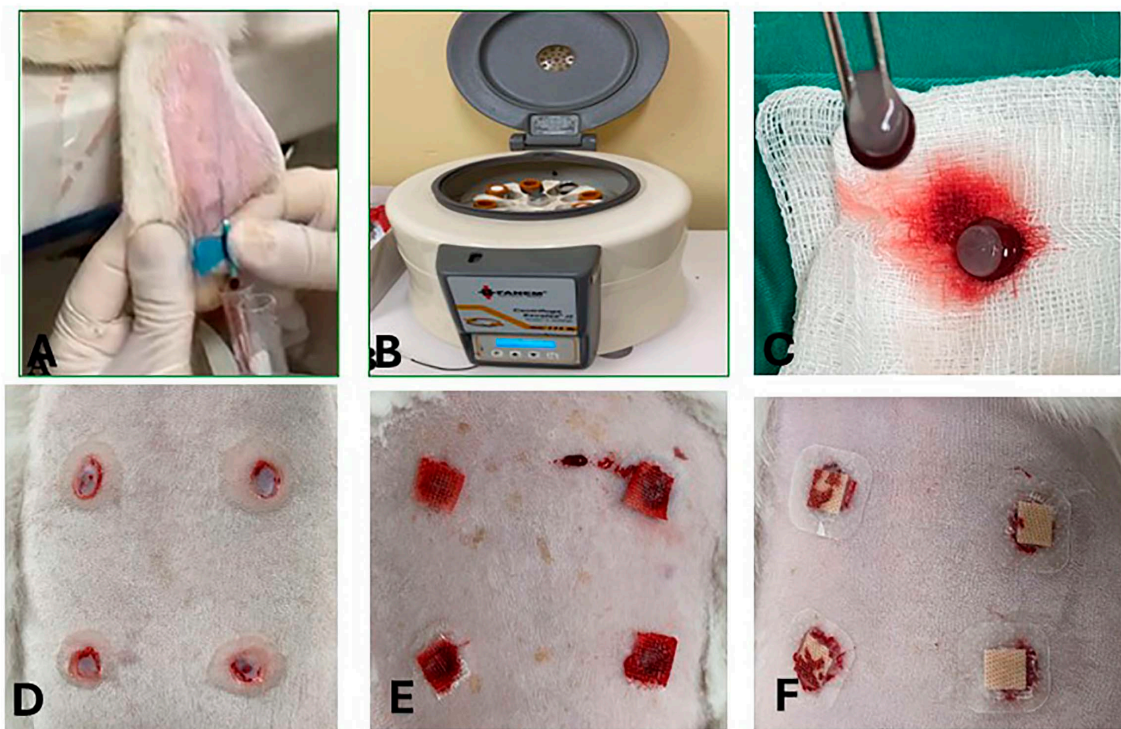


Figura 3. A: coleta de sangue pela veia auricular. B: Centrifugação do material colhido. C: extração do coágulo e separação da FRPa. D: Confecção das feridas. E: Feridas tratadas com FRPa. F: Feridas tratadas e cobertas com Band aid®.

Membranas de quitosana e xantana foram preparadas na proporção 1:1 (Bellini et al., 2015), utilizando 96% de quitosana desacetilada, goma xantana, Pluronic® F-68 e ácido acético, além de β -glicana. A mistura de quitosana foi adicionada à solução de xantana/ β -glicana a 10 mL/min sob agitação de 1000 rpm. O preparo foi mantido a 25°C em reator de vidro, desaerado em vácuo por 2 horas, seco a 37°C, e neutralizado com lavagens em água deionizada e tampão Hepes (10 mM), antes da secagem final a 37°C (fig. 4).



Figura 4.: A-B: preparação da membrana. C: membrana cortada com punch 8mm e pronta para ser reidratada com solução fisiológica.

2.5 Coleta e Processamento de Amostras

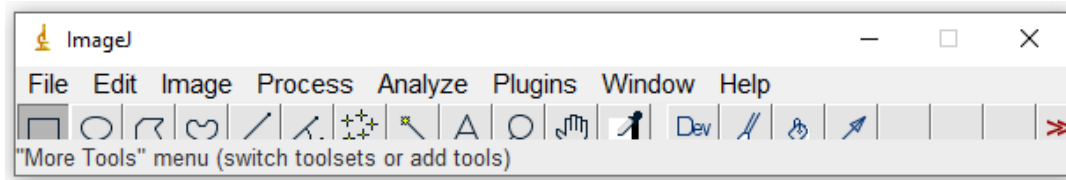
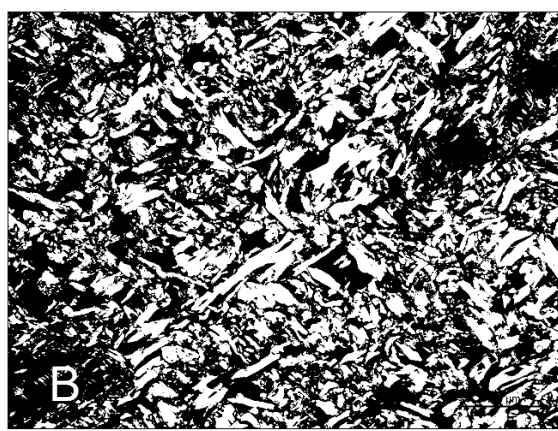
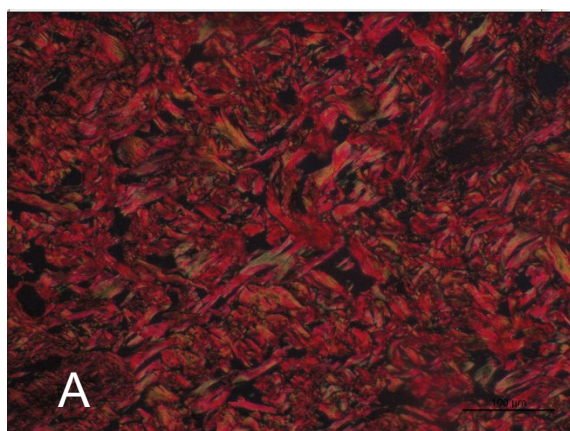
As biópsias foram realizadas nos dias 7,14,21 e 28 (com a utilização de punch de 6 mm) para verificação histológica do processo cicatricial. Após a coleta foram iniciados a preparação da lâmina para análise histopatológica. As amostras de pele foram fixadas em solução de formalina a 10% tamponada com pH 7,0 por 24 horas, e depois lavadas em água corrente por 1 hora. Os fragmentos foram transferidos para uma solução de álcool 70% para posteriormente serem processados conforme a técnica de rotina histológica para microscopia óptica e inclusão em parafina. Os cortes foram corados pelo método do Picrosírius. As avaliações foram realizadas por um único observador e de forma cega.

2.6 Análise da Dimensão Fractal do Colágeno

Para a análise da dimensão fractal da pele, as lâminas coradas tanto com TM quanto Picrosirius foram binarizadas para a leitura e a dimensão fractal foi estimada pelo método—box-counting por meio do software ImageJ (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos— NIH), disponível gratuitamente na internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Foram fotografados 3 campos histológicos da área de lesão de cada animal. O software considerou o box-counting em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse espaço, não considerando, portanto, a textura da imagem. A influência disso é

que duas imagens com a mesma distribuição de pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuirão a mesma dimensão fractal.

Desta forma a análise das lâminas histológicas fractais se baseia na relação entre a resolução e a escala avaliada, e o resultado pode ser quantitativamente expresso com a dimensão fractal do objeto que é $DF = (\log N_r / \log r - 1)$. Sendo N_r a quantidade de elementos iguais necessários para preencher o objeto original e a escala aplicada ao objeto. Com isso, a dimensão fractal calculada com o software ImageJ fica sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes (Fig.5)



Results

File	Edit	Font	Results										
	Label	C2	C3	C4	C6	C8	C12	C16	C32	C64	D		
1	C30D-3p	781906	372785	220107	106333	63798	30761	18273	4888	1271	1.843		

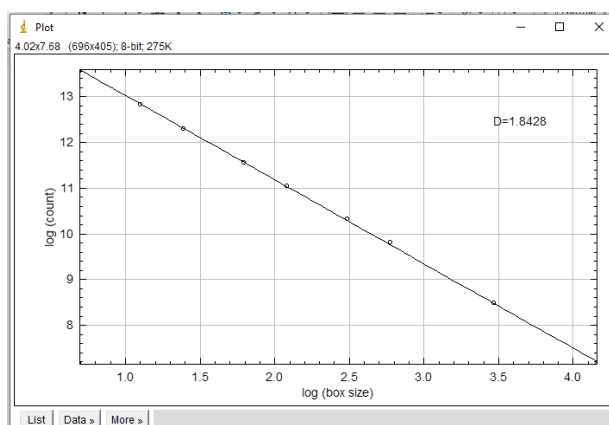


Figura 5.: Processo de captação e leitura das lâminas pelo software Image J. A: lâmina corada com Picrosírius, B: Lâmina binarizada. C-E: leitura pelo software Image J.

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

2.7 Análise Estatística

A avaliação do efeito dos tratamentos foi realizada com o programa estatístico JMP, versão 7.0 (SAS). Inicialmente foi aplicado o teste de normalidade de dados e homogeneidade de variâncias entre grupos. Caso a distribuição dos dados fosse normal ou não-normal, os efeitos foram testados por ANOVA ou Kruskal-Wallis, respectivamente. Os testes de Tukey ou de Dunn foram utilizados para a comparação caso sejam indicadas diferenças por ANOVA ou Kruskal - Wallis, respectivamente. Os dados foram demonstrados por média $\pm$ DP. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

As análises realizadas nos períodos de 7,14 e 28 dias indicaram que a associação de PRFa com o biocurativo de membranas não favoreceu a organização das fibras colágenas, como podemos observar nas representações a seguir (Fig. 6 e 7). Observou-se uma melhor organização nas fibras colágenas dos grupos tratados com a combinação de FRPa e biocurativo (DF=1,82), com padrões morfológicos regulares e maior densidade de fibras em comparação aos grupos membrana (DF=1,91) e FRPa (DF=1,87) aos 21 dias.

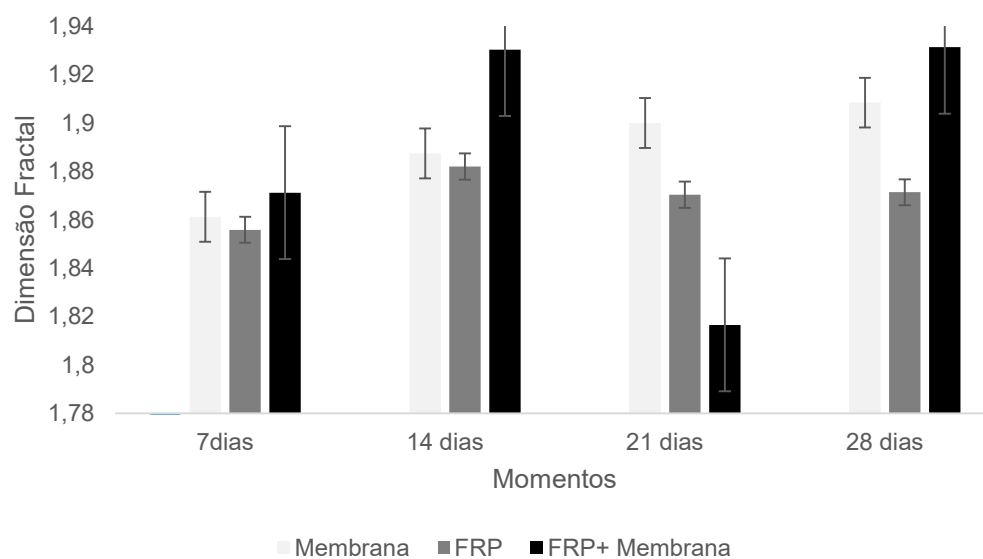


Figura 6.: Valores médios da dimensão fractal de coelhos tratados ou não com biocurativos e FRPa.

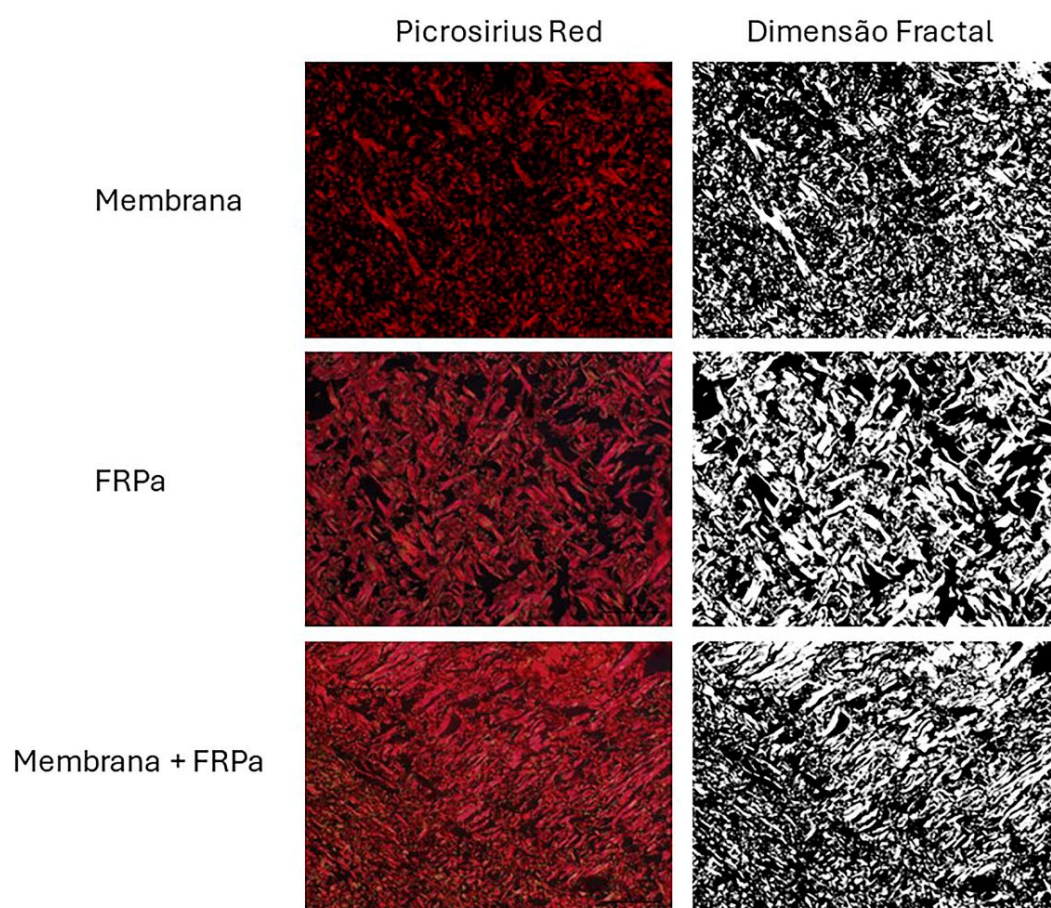


Figura 7: Microscopia e dimensão fractal das feridas experimentalmente induzidas em coelhos e tratadas com biocurativos e FRPa aos 21 dias (aumento 200X).

4. Discussão

A cicatrização de feridas é um processo fisiopatológico complexo, envolvendo vários eventos celulares e bioquímicos simultâneos (Bizinato et al., 2022). O colágeno desempenha um papel essencial nesse processo, fornecendo a estrutura de suporte que facilita a organização do novo tecido. Contudo, distúrbios no processo cicatricial podem levar a cicatrizes desorganizadas ou debilitadas, afetando a integridade da pele e a saúde dos pacientes (Fayne et al., 2020). A quitosana, um biopolímero derivado da quitina, tem sido amplamente estudada como componente de biocurativos devido às suas propriedades bioativas que favorecem a cicatrização (Bellini et al., 2012; Bellini et al., 2015; Bueno et al., 2015; Liu et al., 2021). Os resultados deste estudo indicam que o uso de biocurativo de quitosana e xantana em associação com fibrina rica em plaquetas autóloga (FRPa) pode promover melhorias significativas na cicatrização de feridas dérmicas, especialmente em relação à organização das fibras de colágeno, conforme observado em diversos momentos pós-tratamento. Este achado corrobora com outros estudos que destacam a quitosana como um biomaterial promissor devido às suas propriedades anti-inflamatórias e sua capacidade de estimular a angiogênese e a proliferação de fibroblastos, essenciais para a regeneração tecidual (Taghipour et al., 2020; Wang et al., 2020). Nos primeiros períodos pós-tratamento (dias 7 e 14), a associação do biocurativo com FRPa demonstrou uma densidade moderada de fibras colágenas, porém ainda com organização irregular, o que pode ser justificado pela resposta inicial ao tratamento e pela fase proliferativa do processo de cicatrização. Por outro lado, aos 21 dias foi evidente uma melhora na organização e densidade das fibras colágenas no grupo tratado com a combinação de biocurativo e FRPa, destacando o potencial desta associação para promover uma cicatrização mais estruturada e robusta. Esse resultado está alinhado com a literatura, que ressalta a capacidade da FRPa de promover a organização tecidual, principalmente em conjunto com biomateriais que facilitam a deposição de colágeno e o crescimento de novos vasos sanguíneos (Camargo et al., 2013; Narang et al., 2015). Apesar de a combinação de FRPa e biocurativo ter apresentado resultados superiores em relação aos tratamentos isolados com solução salina ou biocurativo aos 21 dias, algumas limitações foram observadas, como uma

menor organização do colágeno em determinados períodos iniciais e finais, sugerindo que os efeitos da combinação podem ser temporais e dependem da fase específica do processo cicatricial. Este aspecto sugere que futuras investigações poderiam otimizar as formulações e os tempos de aplicação para maximizar os benefícios terapêuticos. Outro ponto de destaque é a contribuição da ferramenta de análise fractal para a caracterização da organização estrutural do colágeno, que permitiu quantificar de forma precisa a complexidade morfológica das fibras colágenas ao longo do processo de cicatrização. Estudos prévios sugerem que o método box-counting é eficaz na avaliação de características morfológicas complexas em tecidos, sendo uma ferramenta útil na pesquisa de regeneração tecidual (Zumarán et al., 2018; Moldovanu et al., 2021).

Conclusão

A associação entre o biocurativo de quitosana e xantana e a FRPa demonstrou ser uma abordagem promissora na cicatrização de feridas dérmicas, promovendo uma organização superior das fibras de colágeno e uma recuperação tecidual mais eficaz. Observou-se que, embora o efeito da combinação seja mais evidente em fases intermediárias do processo cicatricial, ela pode proporcionar uma melhora significativa na qualidade final do tecido regenerado. A análise fractal do colágeno provou-se uma ferramenta eficaz para quantificar a complexidade morfológica, fornecendo evidências objetivas do impacto positivo desse tratamento. Futuros estudos poderiam explorar diferentes formulações e tempos de aplicação para otimizar os resultados, ampliando as possibilidades de uso clínico desta combinação terapêutica.

Aprovação Ética:

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de origem (protocolo nº 8520), 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*.

Financiamento

Esta pesquisa não recebeu nenhuma bolsa específica de agências de fomento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Declaração de Interesse

Os autores declaram que não têm interesses financeiros concorrentes ou relacionamentos pessoais que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

Referências

AZEVEDO, M. C. M. P. S. Application of PRF in dentistry. 2014. 29 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Odontologia) – Faculty of Dentistry, University of Porto, Porto-Portugal, 2014.

BELLINI, M. Z. et al. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 125, p. 421-431, 2012.

BELLINI, M. Z.; OLIVA-NETO, P.; MORAES, A. M. Properties of films obtained from biopolymers of different origins for skin lesions therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 58, n. 2, p. 289-299, mar./abr. 2015.

BIZINOTO, L. B. et al. Wound treatment principles - part two. *International Journal of Health Science*, v. 2, n. 18, 2022.

BUENO, Z.C., Development and Analysis of the Properties of Chitosan and Alginate Membranes containing Polyhexamethylene Biguanide for the Treatment of Skin Lesions, 195p. Thesis (Doctorate in Chemical Engineering), University of Campinas, Campinas, 2015.

BURUIANĂ, A. et al. Fractal dimension analysis of the tumor microenvironment in cutaneous squamous cell carcinoma: insights into angiogenesis and immune cell infiltration. *Fractal Fract.* october, 2024.

CAMARGO, F. F. de et al. Effect of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin on cutaneous wound healing in rats. 2013.

FAYNE, R. A. et al. The potential impact of social genomics on wound healing. *Advances in Wound Care (New Rochelle)*, v. 9, n. 6, p. 325-331, jun. 2020.

LI, L., XING, R., LI, J., LI, P. Fabrication of guanidinylated chitosan nanoparticles loaded with bioactive factors for facilitating wound healing.

International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, v.71, 173–179,2020.

MAWAZI, S.M. et al. Recent applications of chitosan and its derivatives in antibacterial, anticancer, wound healing and tissue engineering fields. *Polymers* May, 2024.

MOLDOVANU, S. et al. Skin lesion classification based on surface fractal dimensions and statistical color cluster features using an ensemble of machine learning techniques. *Cancers*, v. 13, n. 21, p. 5256, out. 2021.

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. *Contemporary Clinical Dentistry*, v. 6, n. 1, p. 63-68, jan./mar. 2015.

RAGINI, B., SHREERAMA, M., SHAUKATALIS, R., & SIVA, S. Preparation, characterization and in vitro wound healing activity of collagen-chitosan film. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, v.11, 5489-5495, 2020.

TAGHIPOUR, N.; DERAVID, N.; RAHIMI, M. Chitosan-based scaffolds, suitable structures for wound healing dressing: a short review. *Journal of Regenerative, Reconstructive and Restorative Medicine*, v. 5, n. 1, p. e11, mar. 2020.

WANG, D. et al. The effect of form of carboxymethyl-chitosan dressings on biological properties in wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 194, p. 111191, out. 2020.

YÜCE E., KÖMERIK N. Potential effects of advanced platelet-rich fibrin as a wound-healing accelerator in the management of alveolar osteitis: A randomized clinical trial. *Niger J Clin Pract.* v.22(9), p.1189-1195,2019.

ZUMARÁN, C. et al. The 3 R's for platelet-rich fibrin: a “super” tri-dimensional biomaterial for contemporary naturally-guided oro-maxillo-facial soft and hard tissue repair, reconstruction and regeneration. *Materials (Basel)*, v. 11, n. 8, p. 1293, jul. 2018.

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 "ANÁLISE FRACTAL DO COLÁGENO NA REGENERAÇÃO DE FERIDAS DÉRMICAS EM COELHOS TRATADAS COM UMA COMBINAÇÃO DE BIOCURATIVO E FIBRINA RICA EM PLAQUETAS AUTÓLOGA", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 8520 e tendo como participante(s) ANA ROSA VIEIRA DE FARIA (discente), CARLA LIMA ZAVATIERI (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 07/02/2024.

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, 22 de Fevereiro de 2024.



Prof. Dr. Air Rodrigues Garcia Jr.
Docente Responsável pela CPDI



Prof. Dr. Poline Rodrigues de Ruediger

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA VETERINARY MEDICINE AND SCIENCE

For authors

Join our community of authors and benefit from:

- An easy-to-use manuscript submission system, without manuscript formatting requirements
- Dedicated editors who are active in their specific communities
- High editorial standards, ensuring all published manuscripts undergo an in-depth peer review process
- Quick, efficient publication with full transparency on all publishing metrics and turnaround times
- Greater impact, reach, and visibility of your research through open access
- Retention of all ownership and copyright of your published research

Language editing and author services

[Wiley Editing Services](#) offers expert help with article preparation, including English Language Editing, translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design - so you can submit your manuscript with confidence.

Submission

At submission you will need to register for a Wiley Researcher ID if you do not already have one (no need to create a new account if you have previously submitted to a Wiley journal or used Wiley Online Library). You will be asked to upload your manuscript file which will automatically be scanned and displayed for you to verify and confirm before submitting. Please note that author details and emails for all co-authors are required at the point of submission. Your manuscript will then be sent on for editorial evaluation and peer review. For technical help, please contact submissionhelp@wiley.com.

Terms of submission

Manuscripts must be submitted on the understanding that they are not published, in press, or submitted elsewhere (with the exception that articles are permitted to be submitted to preprint servers). The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other co-authors. It is also the submitting author's responsibility to ensure that the article has all necessary institutional approvals. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication, unless otherwise indicated. It is a condition of submission that the authors permit editing of the manuscript for readability. All submissions are bound by the publisher's terms of service.

Peer review

The journal follows a single-anonymized peer review model, for applicable article types. Information on the Peer Review model can be found [here](#).

Wiley's policy on the confidentiality of the review process is available [here](#).

All submitted articles are subject to assessment and peer review to ensure editorial appropriateness and technical correctness.

Research published in the journal must be:

- Scientifically valid - adhering to accepted community standards of research.
- Technically accurate in its methods and results.
- Representative of a specific advance, or replication, or null/negative result, which is worthy of publication.
- As reproducible as possible - sharing underlying data, code, and supporting materials wherever able.
- Ethically sound and transparent - adhering to best practice with respect to animal and human studies, consent to publish, and clear declaration of potential conflicts of interests, both real and perceived.

In the spirit of sharing findings through our open science mission, emphasis is not placed on novelty, interest, or perceived impact. Replication studies, particularly of research published in this journal, are encouraged.

In order for an article to be accepted for publication, the assigned editor will first consider if the manuscript meets the minimum editorial standards and fits within the scope of the journal. If an article is considered suitable for the journal, the editor will ideally solicit at least two external peer reviewers (who will remain anonymous to the authors unless they choose to disclose their identity by signing the review report) to assess the article before confirming a decision to accept. Decisions to reject are at the discretion of the editor.

Our research integrity team will occasionally seek advice outside standard peer review, for example, on submissions with serious ethical, security, biosecurity, or societal implications. We may consult experts and the editor before deciding on appropriate actions, including but not limited to: recruiting reviewers with specific expertise, assessment by additional editors, and declining to further consider a submission.

Special Issues

Special Issues are subject to extensive review, during which journal Editors or Editorial Board input is solicited for each proposal. Our approval process includes an assessment of the rationale and scope of the proposed topic(s), and the expertise of Guest Editors, if any are involved. Special Issue articles must follow the same policies as described in the journal's Author Guidelines.

Editor/Editorial Board papers

Papers authored by Editors or Editorial Board members of the title are sent to Editors that are unaffiliated with the author or institution and monitored carefully to ensure there is no peer review bias.

Concurrent submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having three manuscripts under review at any point in time. If an author already has three manuscripts under review in the journal, they will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to editorials or other non-peer-reviewed manuscript types.

Article processing charges

The journal is open access. Article processing charges (APCs) allow the publisher to make articles immediately available online to anyone to read and reuse upon publication.

Preprints

The journal accepts articles previously published on preprint servers, and does not consider this to compromise the novelty of the results. Articles based on content previously made public only on a preprint server, institutional repository, or in a thesis will be considered. The preprint should be cited.

Clinical Trials

When publishing clinical trials, the journal aims to comply with the [recommendations](#) of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trial registration. Therefore, authors are requested to register the clinical trial presented in the manuscript in a public trial registry and include the trial registration number at the end of the abstract. Trials should be registered prospectively before patient recruitment has begun. Where this has not happened, the study must be registered retrospectively, and the date of registration should be clearly stated in the manuscript.

Preregistration of studies

Authors are encouraged to indicate whether the conducted research was preregistered in an independent, institutional registry (e.g., <http://clinicaltrials.gov/>, <https://www.socialscienceregistry.org/>, <http://osf.io/>, <https://egap.org/registry/>, <http://ridie.3ieimpact.org/>). Preregistration of studies involves registering the study design, variables, and treatment conditions prior to conducting the research.

Preregistration of analysis plans

Authors are encouraged to indicate whether or not the conducted research was preregistered with an analysis plan in an independent, institutional registry (e.g., <http://clinicaltrials.gov/>, <https://www.socialscienceregistry.org/>, <http://osf.io/>, <https://egap.org/registry/>, <http://ridie.3ieimpact.org/>). Preregistration of studies involves registering the study design, variables, and treatment conditions. Including an analysis plan involves specification of sequence of analyses or the statistical model that will be reported.

ORCID

At submission, an ORCID iD must be provided for the submitting author(s). If you already have an ORCID iD, you will be asked to provide it.

Article types

The journal will consider the following article types:

Research articles

Research articles should present the results of an original research study. These manuscripts should describe how the research project was conducted and provide a thorough analysis of the results of the project. Systematic reviews may be submitted as research articles.

Reviews

A review article provides an overview of the published literature in a particular subject area.

Formatting

The manuscript should be an editable doc./docx file including text and tables. Please provide figures in the highest resolution possible, whether this means they are embedded or provided separately.

Note: If the manuscript, figures, or tables are difficult for you to read, they will also be difficult for the editors and reviewers, and the editorial office will send them back for revision.

If submitting your manuscript file in LaTeX format via Research Exchange, select the file designation “Main Document – LaTeX .text File” on upload. When submitting a LaTeX Main Document, you must also provide a PDF version of the manuscript for Peer Review. Please upload this file as “Main Document - LaTeX PDF.” All supporting files that are referred to in the LaTeX Main Document should be uploaded as a “LaTeX Supplementary File.” We recommend reviewing the [New Journal Design LaTeX template](#).

We recommend that all manuscripts include line numbers and follow the structure below:

Title and authorship information

The following information should be included:

- Manuscript title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Affiliations. The publisher remains neutral with regard to jurisdictional claims in institutional affiliations. Responsibility for affiliations ultimately rests with the author, although the publisher may request changes be made to countries listed in affiliations to ensure consistency across published output (for indexing and discovery reasons).

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained, citation-free, and should not exceed 300 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and methods

The methods section should provide enough detail for others to be able to replicate the study. If you have more than one method, use subsections with relevant headings, e.g. different models, in vitro and in vivo studies, statistics, materials and reagents, etc.

The journal has no space restriction on methods. Detailed descriptions of the methods (including protocols or project descriptions) and algorithms may also be uploaded as supplementary information or a previous publication that gives more details may be cited. If the method from a previous article is used then this article must be cited and discussed. If wording is reused from a published article then this must be noted, e.g. This study uses the method of Smith et al. and the methods description partly reproduces their wording [1].

If a method or tool is introduced in the study, including software, questionnaires, and scales, the license this is available under and any requirement for permission for use should be stated. If an existing method or tool is used in the research, the authors are responsible for checking the license and obtaining any necessary permission. If permission was required, a statement confirming permission was granted should be included in the materials and methods section.

Publishing protocols. We encourage authors describing any methodology, in particular laboratory-based experiments in the life sciences but also computational and bioinformatics protocols, to upload details of their methods to protocols.io. This is an open access website that allows researchers to record their methods in a structured way, obtain a DOI to allow easy citation of the protocol, collaborate with selected colleagues, share their protocol privately for journal peer review, and choose to make it publicly available. Once published, the protocol can be updated and cited in other articles.

You can make your protocol public before publication of your article if you choose, which will not harm the peer review process of your article and may allow you to get comments about your methods to adapt or improve them before you submit your article (see also the [protocols.io FAQ page](#)).

Results and discussion

This section may be divided into subsections or may be combined.

Main text (review only)

This section may be divided into subsections or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the article, highlighting its importance and relevance.

Data availability

Authors must include a data availability statement with their submission.

When submitting a manuscript, submitting authors will be asked to select from several pre-written statements or use the text editor to tell us about data availability with regard to their submission. Review our [Data Sharing Policy](#) to understand which data availability statement is right for your submission.

Conflicts of interest

Authors must declare all relevant interests that could be perceived as conflicting. Authors should explain why each interest may represent a conflict. If no conflicts exist, the authors should state this. Submitting authors are responsible for co-authors declaring their interests.

Conflicts of interest (COIs, also known as 'competing interests') occur when issues outside research could be reasonably perceived to affect the neutrality or objectivity of the work or its assessment. For more information, see our [publication ethics policy](#). Authors must declare all potential interests - whether or not they actually had an influence - in the conflicts of interest section, which should explain why the interest may be a conflict. If there are none, the authors should state: "The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this article". Submitting authors are responsible for co-authors declaring their interests. Declared conflicts of interest will be considered by the editor and reviewers, and included in the published article.

Authors must declare current or recent funding (including for article processing charges) and other payments, goods or services that might influence the work. All funding, whether a conflict or not, must be declared in the funding statement. The involvement of anyone other than the authors who: i) has an interest in the outcome of the work; ii) is affiliated to an organization with such an interest; or iii) was employed or paid by a funder, in the commissioning, conception, planning, design, conduct, or analysis of the work, the preparation or editing of the manuscript, or the decision to publish must be declared.

You may be asked to make certain changes to your manuscript as a result of your declaration. These requests are not an accusation of impropriety. The editor or reviewer is helping you to protect your work against potential criticisms.

If you are in any doubt about declaring a potential conflict, remember that if it is revealed later - especially after publication - it could cause more problems than simply declaring it at the time of submission. Undeclared conflicts of interest could lead to a corrigendum or, in the most serious cases, a retraction.

Funding statement

Authors must state how the research and publication of their article was funded, by naming financially supporting body(s) (written out in full) followed by associated grant number(s) in square brackets (if applicable), for example: "This work was supported by the Engineering and Physical Sciences Research Council [grant numbers xxxx, yyyy]; the National Science Foundation [grant number zzzz]; and a Leverhulme Trust Research Project Grant".

If the research did not receive specific funding, but was performed as part of the employment of the authors, please name this employer. If the funder was involved in the manuscript writing, editing, approval, or decision to publish, please declare this.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the manuscript before the references. Anyone who made a contribution to the research or manuscript, but who is not a listed author, should be acknowledged (with their permission).

References

Authors may submit their references in any style. If accepted, these will be reformatted in Chicago style by the publisher. Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references should be numbered consecutively in the order of their first citation. Citations of references in the text should be identified using numbers in square brackets e.g., "as discussed by Smith [9]"; "as discussed elsewhere [9, 10]". All references should be cited within the text and uncited references will be removed.

Citation standards. All data, program code, and other methods should be appropriately cited. Such materials should be recognized as original intellectual contributions and afforded recognition through citation.

Date formatting

Dates should be written out fully to avoid confusion with different all-numeral date styles. For example, 11/10/2018 could be 10 November 2018 or 11 October 2018 depending on the reader, therefore, the date should be written out in full. For example, the date September 1, 2018 should be used rather than 01/09/2018 or 09/01/2018.

Units of measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using the International System of Units (SI).

Preparation of figures

Upon submission of an article, authors should include all figures and tables in the file of the manuscript. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the manuscript in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Maps. The publisher remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps. For reasons of consistency, authors are requested to use accepted standard maps as the basis for map figure drawing, for example using the latest standard base-map of Map Press. Responsibility for maps rests with the author and it is their responsibility to also provide any copyright or licence information when using maps that are not owned or created by the author (e.g. Google Maps, etc.)

Preparation of tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Supplementary materials are the additional parts to a manuscript, such as audio files, video clips, or datasets that might be of interest to readers. A section titled supplementary material should be included before the references list with a concise description for each supplementary material file. Supplementary materials are not modified by our production team. Authors are responsible for providing the final supplementary material files that will be published along with the article.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within two to three days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication.

Copyright and permissions

Authors retain the copyright of their manuscripts, and all open access articles are distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations. The submitting author is responsible for securing any permissions needed for the reuse of copyrighted materials included in the manuscript.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Reporting guidelines

Authors are strongly encouraged to use appropriate reporting guidelines when preparing and submitting manuscripts, to maximize transparency and reproducibility. Our editors and reviewers are also encouraged to use them in the review process. Completed checklists should be provided in the supplementary files on submission. We particularly encourage the use of:

- [CONSORT](#) for randomized controlled trials
- [TREND](#) for non-randomized trials
- [PRISMA](#) for systematic review and meta-analyses
- [CARE](#) for case reports
- [STROBE](#) for observational studies
- [STREGA](#) for genetic association studies
- [SRQR](#) for qualitative studies
- [STARD](#) for diagnostic accuracy studies

- [ARRIVE](#) for animal experiments

International Commission on Zoological Nomenclature

When publishing manuscripts which describe a new zoological taxon name, we aim to comply with the requirements of the [International Commission on Zoological Nomenclature \(ICZN\)](#). For all manuscripts that include the naming of a new zoological taxon, authors are requested to contact Zoobank, the online registration system for the International Commission on Zoological Nomenclature, to obtain a Life Science Identifier (LSID).

Authors are requested to insert the following text in the materials and methods section, in a subsection to be called 'Nomenclatural acts': "The new names contained in this article are available under the International Code of Zoological Nomenclature. This work and the nomenclatural acts it contains have been registered in ZooBank. Zoobank Life Science Identifier (LSID) for this publication is: urn:lsid:zoobank.org:pub: XXXXXXXX. The LSID registration and any associated information can be viewed in a web browser by adding the LSID to the prefix <http://zoobank.org/>".

Ethical guidelines

For any experiments on humans, all work must be conducted in accordance with the [Declaration of Helsinki \(1964\)](#). Manuscripts describing experimental work that carries a risk of harm to human subjects must include a statement that the experiment was conducted with the human subjects' understanding and written informed consent, as well as a statement that the responsible ethics committee has approved the experiments.

In the case of any animal experiments, the authors must provide a full description of any anaesthetic or surgical procedure used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment. Approval must be obtained from the relevant ethics committee/Institutional Animal Care and Use Committee where required.

This journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read [Wiley's Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors](#) and [Wiley's Publication Ethics Guidelines](#).

Appeals

Authors may appeal if they feel that the decision to reject was based on: i) a major misunderstanding over a technical aspect of the manuscript; or ii) a failure to understand the scientific advance shown by the manuscript. Appeals requesting a second opinion without sufficient justification will not be considered. To lodge an appeal, please contact the journal by email, quoting your manuscript number. Appeals will only be considered from the original submitting author.