



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

LILIANE VOLTARELLI FURINI

**BIOMATERIAL INOVADOR À BASE DE ZINCO, LÁTEX E PLAQUETAS: UMA
ESTRATÉGIA PROMISSORA CONTRA STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM
MEDICINA VETERINÁRIA**



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

LILIANE VOLTARELLI FURINI

**BIOMATERIAL INOVADOR À BASE DE ZINCO, LÁTEX E PLAQUETAS: UMA
ESTRATÉGIA PROMISSORA CONTRA STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

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:
Prof Dra. Cecília Laposy Santarém

636.089
F984b

Furini, Liliâne Voltarelli.

Biomaterial inovador à base de zinco, látex e plaquetas: uma estratégia promissora contra *Staphylococcus aureus* em Medicina Veterinária / Liliâne Voltarelli Furini. – Presidente Prudente, 2026.
65f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2026.

Bibliografia.

Orientador: Cecília Laposy Santarém.

1. Biocurativo. 2. Ação Antimicrobiana. 3.
Nanopartículas. I. Título.

Catlogação na fonte: Michele Mogni – CRB 8-6204

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: “BIOMATERIAL MULTIFUNCIONAL: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
CONTRA PATÓGENOS DE INTERESSE VETERINÁRIO”**

AUTOR(A): LILIANE VOLTARELLI FURINI

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)

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

REGINA HELENA PIRES

Universidade de Franca - UNIFRAN - Franca (SP)

RODRIGO COSTA DA SILVA

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

Data da realização: Presidente Prudente, 24 de Abril de 2026.

Central de Assinaturas Eletrônicas

Sobre o documento

Assunto: Documento eletrônico
Status do documento: Concluído
Data de criação do documento: 27/04/2026 13:59
Fuso horário: (UTC-03:00) Brasília
Número de assinaturas: 3
Solicitante: KEID RIBEIRO KRUGER (#6495957)

Signatários do documento

CECILIA LAPOSY SANTAREM (PROFESSOR)

clapocy@unoeste.br
Recebido em 27/04/2026 13:59
Assinado em 27/04/2026 14:35
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.131.32.97
ID da assinatura: 0501027

REGINA HELENA PIRES (SIGNATÁRIO EXTERNO)

regina.pires@unifran.edu.br
Recebido em 27/04/2026 13:59
Assinado em 27/04/2026 15:37
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 2804:14c:b382:83df:75e7:4500:30ae:ed09
ID da assinatura: 0501028

RODRIGO COSTA DA SILVA (PROFESSOR)

rodrigossilva@unoeste.br
Recebido em 27/04/2026 13:59
Assinado em 27/04/2026 21:14
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 2804:14d:4e83:4dd2::e351
ID da assinatura: 0501029

URL do documento: <https://www.unoeste.br/oa/e9977688>

Assinatura digital do documento: 30a588ded53aaf3f0df51e7ef5f90b97b3902fo70d1b0dbe54o89e2391047248

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

Mantida pela EPEC - Empresa Prudentina de Educação e Cultura SA

Utilize o QRCode abaixo para conferir a autenticidade deste documento:



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que esteve comigo em todos os momentos, concedendo força e coragem para seguir adiante. Aos meus pais, pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas e por serem meu alicerce ao longo desta jornada. A todos os meus familiares e a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram e me apoiaram para que este passo fosse possível em minha trajetória profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de realizar este mestrado, um sonho que não imaginava conquistar tão cedo.

Agradeço à minha família pelo apoio, incentivo e compreensão ao longo de toda esta jornada, em especial ao meu pai, Ronaldo, e à minha mãe, Lucilene, que estiveram ao meu lado tanto nos momentos de alegria quanto nas dificuldades, sendo meu alicerce em todos os desafios.

Agradeço a todas as pessoas que fizeram parte desta caminhada, contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional e tornando o percurso mais leve.

Agradeço à minha orientadora, professora Cecília, pela dedicação e disponibilidade em todas as fases deste trabalho, auxiliando de forma fundamental para meu desenvolvimento acadêmico e para que eu pudesse dar o melhor de mim em cada etapa da pesquisa.

Agradeço também ao professor Rodrigo pelo auxílio na condução e execução da pesquisa. Seus ensinamentos e contribuições foram essenciais para o desenvolvimento do trabalho e para a obtenção dos resultados alcançados.

Agradeço à professora Ângela pela contribuição acadêmica, pela disponibilização de materiais, compartilhamento de sua experiência e pelo tempo dedicado às orientações.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 170806/2023-5, pelo apoio financeiro, por meio da concessão da bolsa de mestrado, que possibilitou a dedicação e o desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

Biomaterial inovador à base de zinco, látex e plaquetas: uma estratégia promissora contra *Staphylococcus aureus* em Medicina Veterinária

As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* representam um desafio na clínica e na reparação tecidual, principalmente devido ao aumento da resistência aos antibióticos mais utilizados, observado por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em comparação a *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA). Nesse contexto, torna-se necessário o estudo de biomateriais com potencial antimicrobiano e aplicabilidade na cicatrização. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antibacteriano de um biomaterial multifuncional, composto por fibrina rica em plaquetas (FRP), nanopartículas de óxido de zinco e membrana de látex frente as bactérias MRSA e MSSA. Trata-se de um estudo experimental *in vitro*. Foram analisados cinco grupos: (1) controle, (2) membrana de látex impregnada com óxido de zinco, (3) fibrina rica em plaquetas, (4) membrana de látex impregnada com óxido de zinco associada à fibrina rica em plaquetas e (5) nanopartículas de óxido de zinco. As análises incluíram contagem bacteriana total, número de gerações bacterianas, tempo de geração e redução do crescimento após 24 horas. Os resultados demonstraram que o óxido de zinco isolado apresentou a maior redução do crescimento bacteriano para MRSA e MSSA ($p < 0,05$), seguido da membrana de látex impregnada com óxido de zinco, isolada ou associada à fibrina rica em plaquetas, enquanto a fibrina rica em plaquetas isolada não demonstrou efeito antibacteriano. Conclui-se que o óxido de zinco apresentou o maior potencial bacteriano. No entanto, todos os biomateriais avaliados possuem características benéficas para aplicação em feridas, tornando a associação proposta um biomaterial de grande interesse. Ressalta-se a necessidade de estudos *in vivo* para a confirmação de sua eficácia clínica.

Palavras-chave: Biomaterial, nanopartículas, biocurativo, ação antimicrobiana.

ABSTRACT

Innovative biomaterial based on zinc, latex and platelets: a promising strategy against *Staphylococcus aureus* in Veterinary Medicine

Infections caused by *S. aureus* represent a significant challenge in clinical practice and tissue repair, mainly due to the increasing resistance to commonly used antibiotics, particularly observed in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) compared to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). In this context, the study of biomaterials with antimicrobial potential and applicability in wound healing becomes essential. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of a multifunctional biomaterial, composed of platelet-rich fibrin (PRF), zinc oxide nanoparticles, and a latex membrane against *S. aureus*. This is an *in vitro* experimental study. Five groups were analyzed: (1) control, (2) latex membrane impregnated with zinc oxide, (3) platelet-rich fibrin, (4) latex membrane impregnated with zinc oxide associated with platelet-rich fibrin, and (5) zinc oxide nanoparticles. The analyses included total bacterial count, number of bacterial generations, generation time, and growth reduction after 24 hours. The results demonstrated that zinc oxide alone showed the greatest reduction in bacterial growth for both MRSA and MSSA ($p < 0.05$), followed by the latex membrane impregnated with zinc oxide, either alone or associated with platelet-rich fibrin, while platelet-rich fibrin alone did not demonstrate antibacterial activity. It is concluded that zinc oxide exhibited the highest antibacterial potential. However, all evaluated biomaterials present beneficial characteristics for application in wound healing, making the proposed combination a biomaterial of great interest. Further *in vivo* studies are required to confirm its clinical efficacy.

Keywords: Biomaterial, nanoparticles, bio-dressing, antimicrobial action.

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	– Análise de variância de amostras repetidas
ATCC	– American Type Culture Collection
BHI	– Brain Heart Infusion
EUCAST	– European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing
FC	– Fator de crescimento
FRP	– Fibrina rica em plaquetas
M	– Membrana de látex
MRSA	– <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	– <i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
PRP	– Plasma rico em plaquetas
SRD	– Sem raça definida
UFC	– Unidade formadora de colônia
ZnO	– Óxido de zinco
ZnONPs	– Nanopartículas de óxido de zinco

SUMÁRIO

	IMPACTO POTENCIAL DESSA PESQUISA.....	14
1	ARTIGO.....	15
	REFERÊNCIAS.....	39
	ANEXOS	43
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	43
	ANEXO B – NORMAS DA REVISTA VETERINARY DERMATOLOGY.....	44

IMPACTO POTENCIAL DESSA PESQUISA

Este estudo avaliou uma membrana de látex impregnada com nanopartículas de óxido de zinco, e em combinação com fibrina rica em plaquetas (FRP), no controle de *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). A proposta se alinha aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS 3 e 9), ao buscar soluções inovadoras, acessíveis e eficazes para o tratamento de feridas.

Os resultados demonstraram que o óxido de zinco isolado apresentou o melhor desempenho, promovendo a maior redução da carga bacteriana e dos parâmetros de crescimento bacteriano. As combinações com membrana de látex e FRP apresentaram efeitos intermediários, embora com potencial complementar, reforçando o papel desses biomateriais no suporte à cicatrização.

De modo geral, a integração dos materiais avaliados resultou em um biomaterial promissor, com propriedades favoráveis ao reparo tecidual, como estímulo à angiogênese, ação antimicrobiana e ao suporte à síntese de colágeno, além de ser um material de baixo custo. Assim, o estudo contribui para o avanço de alternativas sustentáveis e inovadoras para o tratamento de feridas, com potencial aplicação clínica futura.

ARTIGO

Título: Biomaterial multifuncional: atividade antibacteriana contra patógenos de interesse veterinário.

Running title: Biomaterial de látex-ZnO-PRF com atividade antibacteriana.

Autores:

Liliane Voltarelli Furini¹ | Camila Roncada Ramos¹ | Carla Munhoz Maris² | Rodrigo Costa da Silva³ | Angela Mitie Otta Kinoshita⁴ | Cecília Laposy Santarém³

Afiliações:

1 Discentes do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

2 Discente de graduação do curso de Medicina na Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

3 Docentes do programa de Ciência Animal na Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

4 Docente do programa em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional na Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Endereço de correspondência: claposy@unoeste.br

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: Veterinary dermatology, CiteScore: 3.3, SJR 2024: 0.725. Percentil 77%. A2.

RESUMO

Contexto: As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) representam um desafio na clínica e na reparação de tecidos. Com isso, faz-se necessária a busca por novos biomateriais que tenham potencial antimicrobiano, tendo em vista que essas bactérias geram resistência a antibióticos.

Hipótese/Objetivo: Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito antibacteriano de um biomaterial multifuncional composto por FPR, associada ou não a membrana de látex impregnada com óxido de zinco em bactérias MRSA e MSSA. A hipótese do estudo foi que os biomateriais utilizados possuem efeito antibacteriano quando utilizados associados.

Material e métodos: Foi realizado um estudo experimental *in vitro* com 5 grupos experimentais, sendo eles, controle, membrana impregnada com óxido de zinco, fibrina rica em plaquetas, membrana de látex impregnada com óxido de zinco combinada com fibrina rica em plaquetas e óxido de zinco. Esses tratamentos foram desafiados às bactérias MRSA e MSSA. Para as análises foram feitas contagem bacteriana total, número de gerações bacterianas, tempo de gerações e porcentagem de redução do crescimento.

Resultados: O óxido de zinco isolado apresentou o melhor resultado, com redução do crescimento de MRSA e MSSA ($p < 0,05$). A membrana de látex impregnada com óxido de zinco e sua combinação com fibrina apresentou resultados intermediários. A fibrina rica em plaquetas isolada, nesse estudo, não demonstrou efeito bactericida, e na análise de porcentagem de redução de crescimento, observou estímulo do crescimento bacteriano.

Conclusão: O óxido de zinco apresentou maior potencial como biomaterial, enquanto a membrana de látex e suas combinações se destacam pela liberação controlada. Estudos *in vivo* são necessários para confirmar a eficácia clínica.

INTRODUÇÃO

A pele é um órgão de extrema importância e atua como uma barreira de proteção. Em resposta a lesões, ela possui a capacidade de regenerar sua estrutura¹. O processo de cicatrização ocorre em fases distintas: hemostasia, inflamação, proliferação celular e remodelação tecidual².

Durante a cicatrização, podem ocorrer infecções oportunistas, sendo o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) um dos principais patógenos associados a complicações nesse processo³. É uma bactéria gram-positiva, capaz de causar infecções graves, sendo uma delas a infecção de pele e tecidos⁴.

A partir da década de 1960, surgiram cepas resistentes a antibióticos, dificultando ainda mais o tratamento. Entre elas, destaca-se o *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA)⁵.

Diversos biomateriais têm sido explorados com o objetivo de favorecer a regeneração tecidual. Dentre eles, o látex natural, extraído da seringueira (*Hevea brasiliensis*), devido à sua biocompatibilidade e potencial em aplicações biomédicas⁶. O látex contém compostos orgânicos que requerem estabilização por meio da adição de amônia quando não é utilizado imediatamente e necessita ser armazenado⁷.

Esse biomaterial também é capaz de induzir a formação de novos vasos sanguíneos e estimular a produção de matriz extracelular⁸. Além disso, o látex pode ser utilizado como sistema de liberação controlada de nanopartículas e outros biomateriais⁹⁻¹⁰.

Nesse contexto, as nanopartículas têm se mostrado eficazes no combate a bactérias resistentes, representando uma alternativa promissora aos tratamentos convencionais¹¹.

Especificamente, nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs) possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e estimuladoras da proliferação celular, sendo altamente indicadas para aplicações em cicatrização de feridas¹².

A incorporação de nanopartículas em membranas de látex natural foi investigada como uma estratégia para potencializar suas propriedades terapêuticas. Guidelli et al.¹³ exploraram o desenvolvimento de membranas de látex impregnadas com nanopartículas de prata, destacando seus efeitos benéficos na cicatrização de feridas cutâneas. As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NPs) tem uma

importante atividade bactericida pois atua deteriorando a membrana celular e induzindo o estresse oxidativo das bactérias¹⁴. O ZnO também auxilia na produção de colágeno e na biomineralização, resultando em um material de interesse na regeneração de tecidos¹⁵.

Outro biomaterial que tem sido utilizado na regeneração tecidual é a fibrina rica em plaquetas (FRP). Ela é sintetizada no final da cascata de coagulação e é compatível com diversas superfícies biológicas¹⁶. Sua obtenção é por meio da centrifugação de uma amostra autóloga. Nela encontramos Fatores de Crescimento (FC) tecidual assim como ação antimicrobiana, grande concentração de leucócitos e plaquetas, e também estimula a angiogênese. Seu preparo não necessita de fatores anticoagulantes que quando aplicados em uma lesão podem ser prejudiciais à cicatrização¹⁷⁻¹⁸. A FRP tem capacidade de oferecer uma liberação gradual dos fatores presentes em sua composição, mantendo-se ativa e estimulando a ferida por mais tempo, esse mecanismo é uma das vantagens na aplicação clínica¹⁷⁻¹⁸.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antibacteriano de um biomaterial multifuncional composto por FPR, associada a membrana de látex impregnada com óxido de zinco em bactérias MRSA e MSSA. A hipótese do estudo foi que os biomateriais utilizados possuem efeito antibacteriano quando utilizados associados.

MÉTODOS

Local do Experimento

Todos os experimentos foram realizados nos laboratórios de análises clínicas e microbiológicas da Universidade. Sendo eles, processamento das amostras de sangue, hemograma, contagem de células e plaquetas, processamento das suspensões utilizadas como tratamento no presente projeto, processamento das amostras microbiológicas e exposição dos tratamentos às bactérias.

Delineamento amostral

Todos os experimentos foram realizados utilizando um desenho randomizado em bloco. O tamanho amostral proposto no presente estudo foi calculado utilizando-se o método de equação de recursos ("*resource equation*") com base na lei dos rendimentos decrescentes ("*law of diminishing returns*"), descrito por Festing¹⁹.

Resumidamente, o tamanho amostral apropriado foi determinado pelo número de graus de liberdade para o erro na análise de variância (ANOVA) ou teste *t*, utilizando a fórmula: $E = N - T - B$, onde E, N, T, e B correspondem ao erro, total de observações, tratamentos e blocos (replicatas) utilizados no ANOVA, respectivamente. Para este cálculo, o possível erro, E, deve estar entre 10 e 20.

Assim, considerando cada placa de cultura de cada grupo (tubo ensaiado) utilizado o utilizando o teste *kill curve assay* como uma unidade experimental e cada tratamento (fibrina, nanopartículas de óxido de zinco, membrana de látex + nanopartículas de óxido de zinco, membrana de látex + nanopartículas de óxido de zinco + fibrina, e o controle), incubados, não será necessária a repetição do experimento (portanto, um bloco). Assim, o cálculo para o experimento com uma replicata é: $E = 14 - 4 - 0 = 10$ (para cada bactéria), porque serão 15 observações totais (três placas por tratamento), cinco tratamentos e um bloco.

Os experimentos para cada bactéria foram realizados de forma independente, simultaneamente. Os tratamentos foram os mesmos para cada bactéria, discriminados como grupo A (MRSA) e B (MSSA). Dentro de cada grupo, subgrupos serão determinados de 1 a 5 com base nos tratamentos utilizados, discriminados como 1 (controle), 2 (membrana de látex + nanopartículas de óxido de zinco), 3 (fibrina), 4 (membrana de látex + nanopartículas de óxido de zinco + fibrina), 5 (nanopartículas de óxido de zinco), como segue no Quadro 1.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) protocolo 9623.

Preparo da Fibrina rica em plaquetas (FRP)

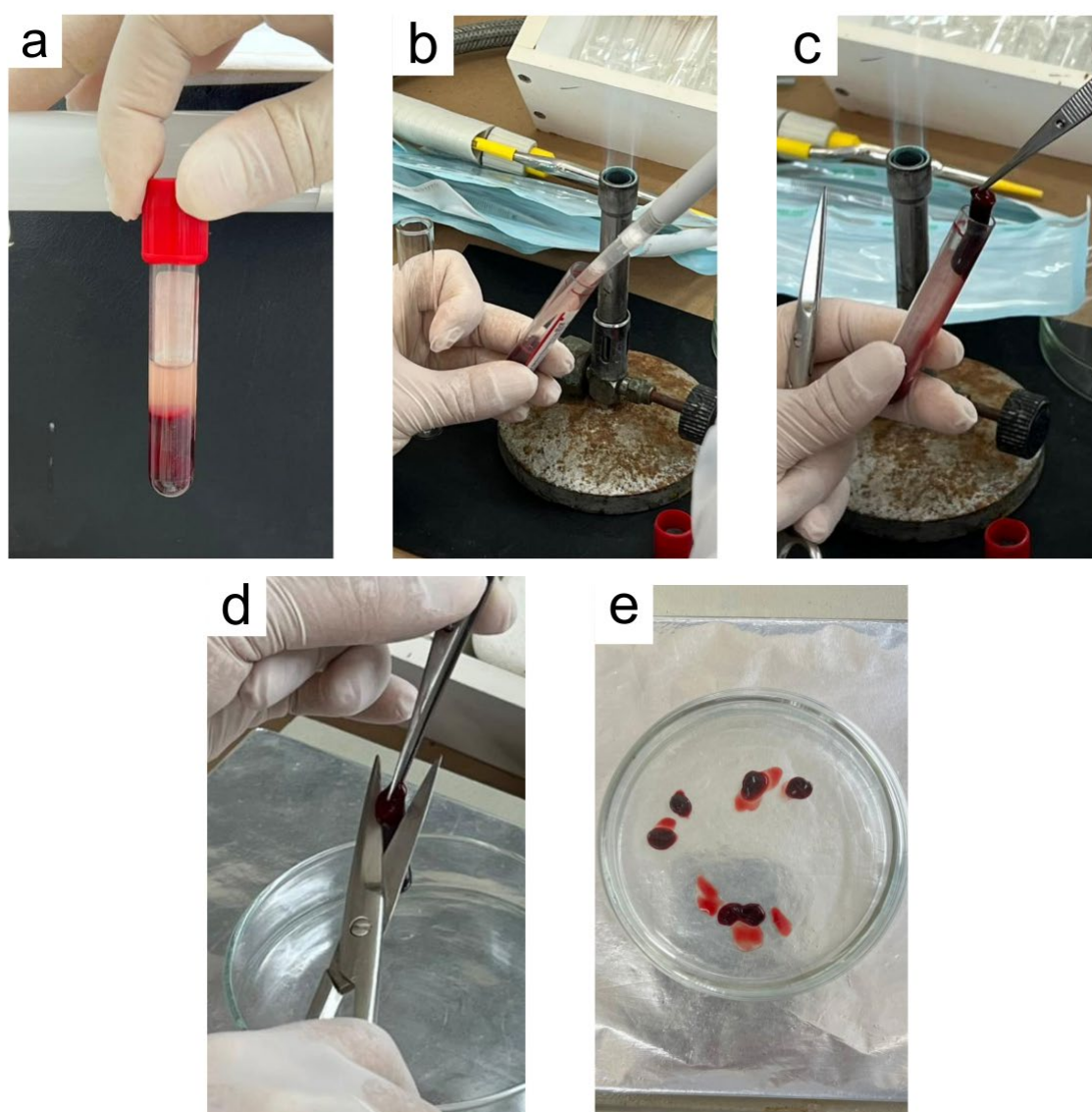
Foi selecionado 1 animal, da espécie canina (*Canis familiaris*), adulto, sem raça definida (SRD), hígido, proveniente da rotina do setor de Clínica Médica de Pequenos Animais da Clínica Veterinária Escola, UNOESTE. O animal amostrado foi selecionado com base nos critérios de inclusão, onde ele não foi exposto a qualquer tipo de medicação ou vacinação por até 2 meses antes da amostragem sanguínea, sem doenças hematológicas, incluindo hematozoários. O estado de saúde deste animal foi confirmado por meio de anamnese, exames físicos e rotina de triagem sanguínea, como hemograma com pesquisa de hematozoários, contagem de plaquetas (que deveria estar acima de $200.000/\text{mm}^3$ e o animal apresentou

176 contagem de 339.000/mm³), e parâmetros fisiológicos para avaliação da função
177 renal (uréia e creatinina) e hepática (fosfatase alcalina, alanino aminotransferase),
178 realizadas por avaliação bioquímica no Analisador Bioquímico Automatizado Cobas
179 C111 (Roche, Brasil).

180 Assim que o animal foi selecionado, amostra de sangue foi coletada com tubo
181 vacutainer a partir da punção da veia jugular sendo 4 mL em um tubo seco sem
182 anticoagulante para preparo da fibrina rica em plaquetas. A amostra foi coletada
183 somente no momento do processamento para evitar ativação e agregação
184 plaquetária. A amostra foi processada no Laboratório de Análises Clínicas, da
185 Clínica Veterinária Escola, até o momento da realização da exposição às bactérias.

186 Após a coleta o material foi centrifugado em baixa velocidade (200G - centrífuga
187 Excelsa Baby 206R) durante 10 minutos para ativação das plaquetas e
188 polimerização da fibrina. O coágulo de FRP foi retirado do tubo, separado dos
189 demais constituintes, e seccionado, os fragmentos de FRP tiveram um peso
190 aproximado de 0,7g (Fig 1).

191



192

193 Figura 1 – Preparo da fibrina rica em plaquetas para uso na pesquisa - (a) Tubo sem
 194 anticoagulante contendo sangue centrifugado, evidenciando a separação entre soro
 195 e coágulo; (b) Remoção da fração de soro após centrifugação; (c) Retirada do
 196 coágulo para manipulação; (d) Secção do coágulo para obtenção dos fragmentos;
 197 (e) Fragmentos resultantes após o corte.

198 Nanopartículas de Óxido de Zinco (ZnO-NP)

199 Para síntese de ZnO-NP, foram utilizados o hidróxido de sódio (NaOH) e sulfato
 200 de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e água ultrapura, conforme trabalhos
 201 prévios²⁰⁻²¹. O método consiste em realizar a diluição dos solutos em soluções
 202 distintas, na proporção de 1:4. de heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e hidróxido de sódio
 203 (NaOH). Foram usados 1,6442 g de NaOH pureza 97,5% (0,4 M) e 3,1170 g de
 204 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pureza 92,3% (0,1 M) dissolvidos em 100 mL de água ultrapura. A

solução de sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foi adicionado por gotejamento à solução de hidróxido de sódio (NaOH) e mantido sob agitação magnética (agitador magnético) de 800 rpm durante 15 minutos. O produto branco obtido foi lavado com água ultrapura em papel filtro quantitativo, da marca Unifil, faixa azul, filtrado em pressão negativa. A amostra foi seca em estufa a 60°C por uma hora e a seguir será macerado em gral de ágata²².

Após a síntese da ZnO-NP foi realizado tratamento térmico em mufla na temperatura de 150°C por um tempo de exposição de 3 horas cada para análise de morfologia das partículas²³.

A caracterização físico-química da nanopartícula foi realizada por Difração de Raios-X (DRX), para obter informações sobre a cristalinidade e dimensões dos cristalitos. Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG), para análise da morfologia das nanopartículas.

Desenvolvimento da biomembrana de Látex Natural

Foi utilizado o látex em suspensão de amônia, obtido de empresa privada Massaborr, de Parapuã, SP. Para a incorporação de ZnO-NP na matrix do látex, foram adotados procedimentos de trabalhos prévios¹³. Inicialmente, um volume conhecido da solução de látex foi seco em estufa para se determinar a massa total de borracha presente no material.

Posteriormente foram adicionadas ZnO-NPs no látex em suspensão, nas quantidades de 10% e 30% da quantidade de borracha presente, além da referência, 0%. Posteriormente, essa solução será depositada em placas de Petri, polimerizada em estufa a 40°C , a fim de se ter ao final, uma biomembrana de aproximadamente 1,5 mm de espessura.

Produção das membranas de látex impregnadas com nanopartículas de óxido de zinco

Para a obtenção das membranas impregnadas com nanopartículas de óxido de zinco (ZnO), 6 mL de látex foram adicionados em duas placas de Petri e submetidos à estufa a 35°C por aproximadamente 5h. Em seguida, foi preparada a solução de recobrimento composta por 2 mL de látex, 2 mL de água destilada e 750 mg de

nanopartículas de ZnO. A mistura foi homogeneizada em agitador orbital Kline por 5 min.

Após a secagem inicial das membranas de 6 mL, 1 mL da solução de recobrimento foi aplicada sobre a superfície superior de cada membrana, que então foi levada novamente à estufa por 1h. Esse processo foi repetido mais uma vez, no total foram adicionados 2 ml da solução em cada lado da membrana. Uma vez seca, a membrana foi removida da placa, invertida e o procedimento de recobrimento foi repetido no lado oposto. Após a secagem completa dos dois lados, as membranas foram recortadas com punch de 8 mm. Foram necessários 2 mL em cada lado, considerando que durante o processo de secagem em estufa ocorre uma perda aproximada de 1 mL de água.

Para a determinação da densidade da solução de recobrimento contendo nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NPs), foi realizado um cálculo baseado no volume da solução utilizada e na área das placas de Petri.

Inicialmente, considerando a proporção de preparo da solução (4 mL contendo 750 mg de ZnO-NPs), foi aplicada uma regra de três para determinar a quantidade de nanopartículas presente no volume de 2 mL utilizado no recobrimento:

$$4 \text{ mL} \rightarrow 750 \text{ mg}$$

$$2 \text{ mL} \rightarrow X$$

Assim, obteve-se:

$$X = 375 \text{ mg de ZnO-NPs}$$

Em seguida, foi calculada a área da placa de Petri, considerando o diâmetro de 7,5 cm. Utilizando a fórmula da área do círculo, obteve-se uma área aproximada de 17,20 cm².

Por fim, a densidade de nanopartículas depositadas por unidade de área foi determinada pela razão entre a massa de ZnO-NPs e a área da placa, resultando em:

Densidade = 375 mg / 17,20 cm² ≈ 21,80 mg/cm². Dessa forma, a solução de recobrimento apresentou uma densidade aproximada de 21,80 mg de ZnO-NPs por cm² de membrana.

Todas as membranas foram submetidas à esterilização por luz ultravioleta na capela de fluxo laminar antes de serem utilizadas no experimento. (Fig 2).

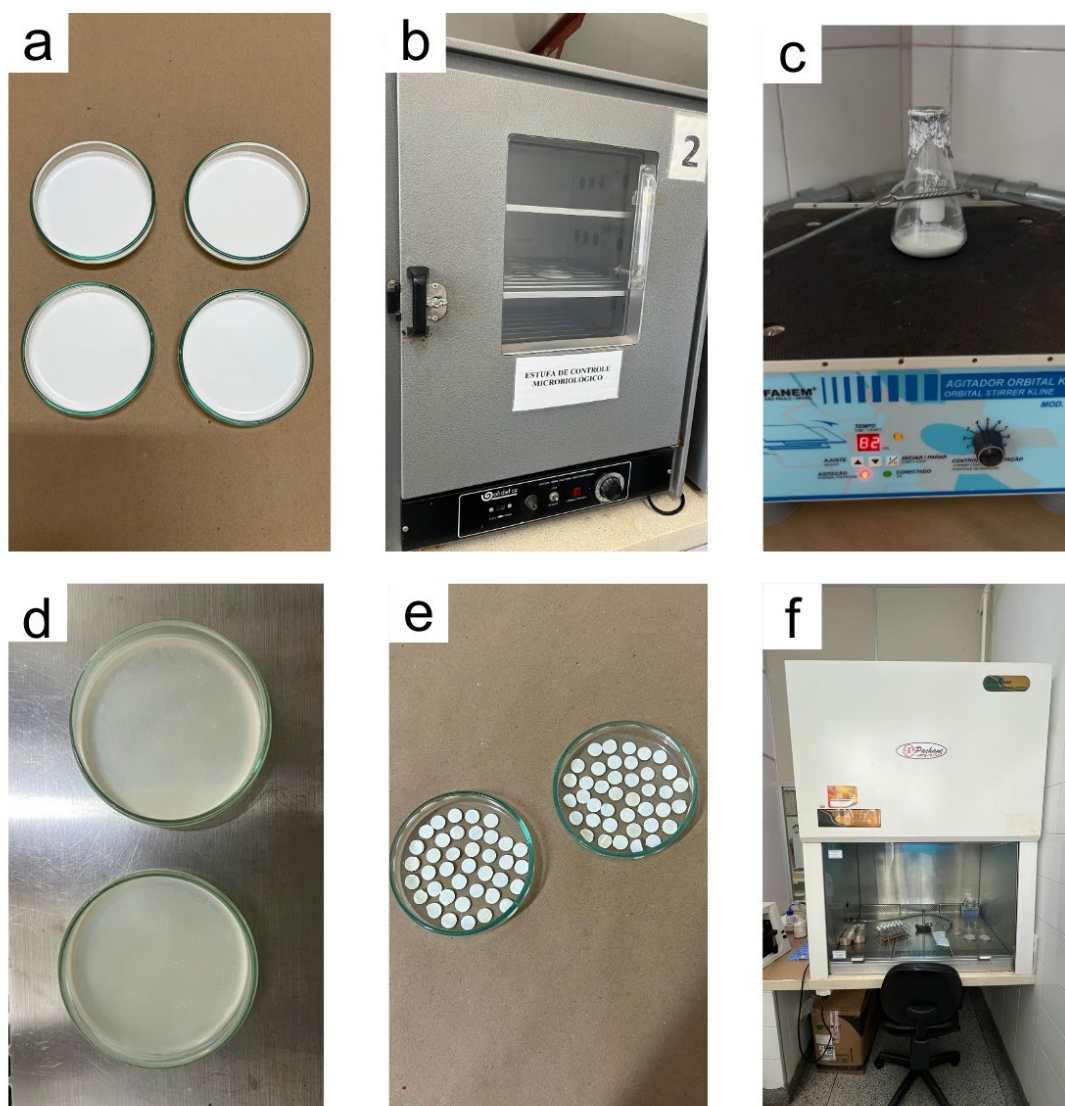


Figura 2 – Preparo da membrana de látex impregnada com óxido de zinco - a) Placa de Petri contendo o látex; b) Secagem do látex em estufa a 35 °C para formação da membrana; c) Solução de recobrimento com óxido de zinco no agitador para homogeneização; d) Membranas finalizadas e já impregnadas com óxido de zinco; e) Membranas recortadas em discos de 8 mm utilizando punch dermatológico; f) Esterilização final das membranas por exposição à luz ultravioleta em capela de fluxo laminar, imediatamente antes do uso.

Cepas bacterianas

Foram utilizadas as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA, cepa ATCC 33591 (ATCC®, EUA) e *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA, isolada e caracterizada na rotina diagnóstica do Laboratório de Microbiologia, da Clínica Veterinária Escola, UNOESTE. As cepas

bacterianas mencionadas acima foram assim classificadas por apresentar resistência (MRSA) ou sensibilidade (MSSA) a diferentes antibióticos β -lactâmicos. As cepas foram mantidas sob refrigeração em estoque no laboratório e, ao iniciar o projeto, foram semeadas em meio de cultura ágar sangue ovino 5% (BAP-5%) e incubadas a 37°C, 24-48 horas, em estufa de cultura bacteriológica ECB-2 (Olidef, Brasil). Após crescimento, realizou-se novos testes bioquímicos para confirmação do gênero e espécie *Staphylococcus aureus* (provas de catalase, DNase, fermentação de manitol, coagulase e teste de sensibilidade a polimixicina B) e novo antibiograma, testando-se o princípio ativo β -lactâmicos, cefoxitina, para confirmação de seu caráter fenotípico. Uma vez confirmados os perfis MRSA e MSSA, procedeu-se o início das coletas de sangue para o desenvolvimento do estudo. Todos os procedimentos microbiológicos foram realizados no interior de Capela Fluxo Laminar 410 (Pachane, Brasil).

Perfil antimicrobiano plaquetário *in vitro*

Teste *Kill curve assay* (contagem de UFC/mL)

O protocolo do experimento *kill curve assay* foi realizada de acordo com o proposto por Li e Li²⁴, com adaptações. Após crescimento *overnight* das bactérias *S. aureus* (MRSA e MSSA, em experimentos separados) em placa contendo meio de cultura ágar sangue ovino 5% (BAP-5%), adicionou-se colônias bacterianas em 5 mL de infusão cérebro-coração (BHI), de modo a obter uma suspensão bacteriana, para cada bactéria, com densidade 0,5 na escala de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). O tubo foi homogeneizado vigorosamente em agitador tipo *vórtex*. A partir desta concentração, preparou-se uma diluição de 100x deste inóculo, utilizando-se infusão BHI para se obter a concentração de 1×10^6 UFC.mL⁻¹ para cada bactéria (inoculo). O inoculo será mantido em gelo até o momento da inoculação nos tubos do experimento.

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

Primeiramente, adicionou-se 1,8 mL BHI em cada tubo dos experimentos para cada bactéria e, posteriormente, 0,2 mL inoculo nos respectivos tubos (concentração de 1×10^5 UFC/mL). Adicionou-se os respectivos tratamentos a cada grupo. Todas as membranas utilizadas no estudo foram esterilizadas previamente a sua adição

aos ensaios por exposição a luz ultravioleta. Os tubos foram incubados a 37°C com agitação orbital a 150 rpm em Agitador de Tubos de Ensaio 251 (Fanem, Brasil). Em momentos pré-determinados (*timepoints* 0 e 24 horas), as suspensões foram homogeneizadas por pipetagem repetitiva, pois a bactéria poderia estar presa no interior do gel ou sedimentadas, e foram semeadas (alíquotas de 100 µL) em 3 (três) placas de Petri contendo meio de cultura BAP-5% para contagem de UFC.mL⁻¹. Para o momento 0 horas, alíquotas (20 µL) de cada tudo foram coletadas, diluídas em 1980 µL solução salina estéril (SST) 0,9% (diluição 10⁻²). Para o momento 24 horas, alíquotas (2 µL) de cada tudo foram coletadas, diluídas seriadamente, primeiramente, em 1998 µL solução salina estéril (SST) 0,9% (diluição 10⁻³), seguida de nova diluição de 2 µL de cada tudo em 1998 µL solução salina estéril (SST) 0,9% (diluição 10⁻⁶) e, por fim, nova diluição de 2 µL de cada tudo em 1998 µL solução salina estéril (SST) 0,9% (diluição 10⁻⁹). Todas as culturas foram incubadas a 37°C, *overnight*, para posterior contagem macroscópica de UFC.mL⁻¹ das placas, sendo então registradas.

Para obtenção dos valores corrigidos de UFC.mL⁻¹, os valores obtidos em cada placa foram multiplicados pelos respectivos fatores de correção gerados nas diluições acima reportadas.

Quadro 1 - Experimento *kill curve assay* para avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes tratamentos em relação as cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA: A1-A5) e *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA: B1-B5).

ID	Grupos	TRATAMENTO	BHI	MRSA	MSSA
A1	Controle	–	1800 µL	200 µL	–
A2	M-Z	membrana e óxido de zinco	1800 µL	200 µL	–
A3	F	Fibrina	1800 µL	200 µL	–
A4	M-Z-F	membrana, óxido de zinco e fibrina	1800 µL	200 µL	–
A5	ZnO	óxido de zinco	1800 µL	200 µL	–
B1	Controle	–	1800 µL	–	200 µL
B2	M-Z	membrana e óxido de zinco	1800 µL	–	200 µL
B3	F	Fibrina	1800 µL	–	200 µL
B4	M-Z-F	membrana, óxido de zinco e fibrina	1800 µL	–	200 µL
B5	ZnO	óxido de zinco	1800 µL	–	200 µL

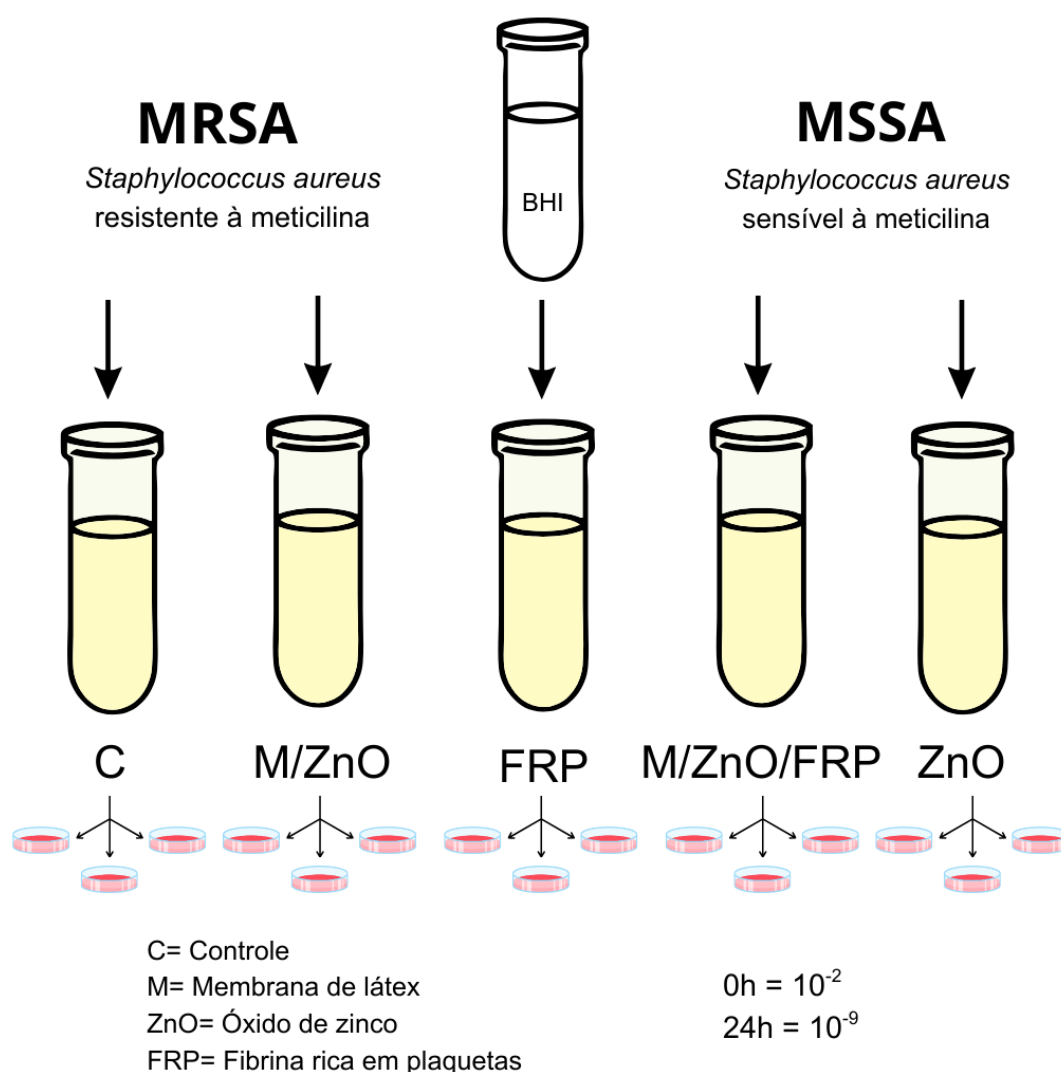


Figura 3 - Distribuição dos tratamentos aplicados às cepas MRSA e MSSA, incluindo: controle (C), membrana de látex com óxido de zinco (M/ZnO), fibrina rica em plaquetas (FRP), combinação M/ZnO/FRP e óxido de zinco isolado (ZnO).

Análise estatística

Todos os dados referentes as contagens de unidades formadoras de colônia (UFC.mL⁻¹) foram tabulados em planilha Excel. Para efeito de análise, as contagens de unidades formadoras de colônia (UFC.mL⁻¹) obtidas nos diferentes tipos de tratamento foram transformadas pela conversão em log (10*contagem) e normalizados pelas diferenças de valores observados nos grupos tratamento em relação ao grupo controle no momento 0 horas. Ainda previamente as análises, foi verificada a distribuição dos dados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-

Smirnov (KS) para posterior seleção do melhor teste estatístico. Como os dados para todas as comparações apresentaram distribuição normal para as análises das contagens de UFC por grupo, distribuídas nas três replicatas, aplicou-se o teste paramétrico de Análise de Variância de amostras repetidas (ANOVA), com o teste de Tukey para comparações múltiplas pós-teste, quando analisado o momento 24 horas em relação ao 0 horas para as bactérias *Staphylococcus aureus*, sem distinguir MRSA ou MSSA, e ANOVA de um fator quando analisados o mesmo momento para MRSA e MSSA separadamente.

Para a avaliação do efeito de cada tratamento na redução da capacidade de multiplicação bacteriana avaliou-se a divisão do log10 da contagem bacteriana em 24 horas de cada grupo tratamento pelo grupo controle. Para esta análise considerou-se o grupo controle como zero (0,00).

Calculou-se ainda o tempo de geração bacteriana (g), isto é, o tempo que uma população bacteriana leva para dobrar de número, cuja fórmula básica deriva do crescimento exponencial, como segue:

$$n = \frac{\log N1 - \log N0}{\log 2},$$

onde n é o número de gerações no período de tempo (t = 24 horas), N0 é número inicial de bactérias no momento 0, e N1 é número final de bactérias no momento 24 horas, obtendo-se no número de gerações bacterianas no dado período. Posteriormente, o resultado da fórmula acima foi aplicado na fórmula para o cálculo do tempo de geração, como segue:

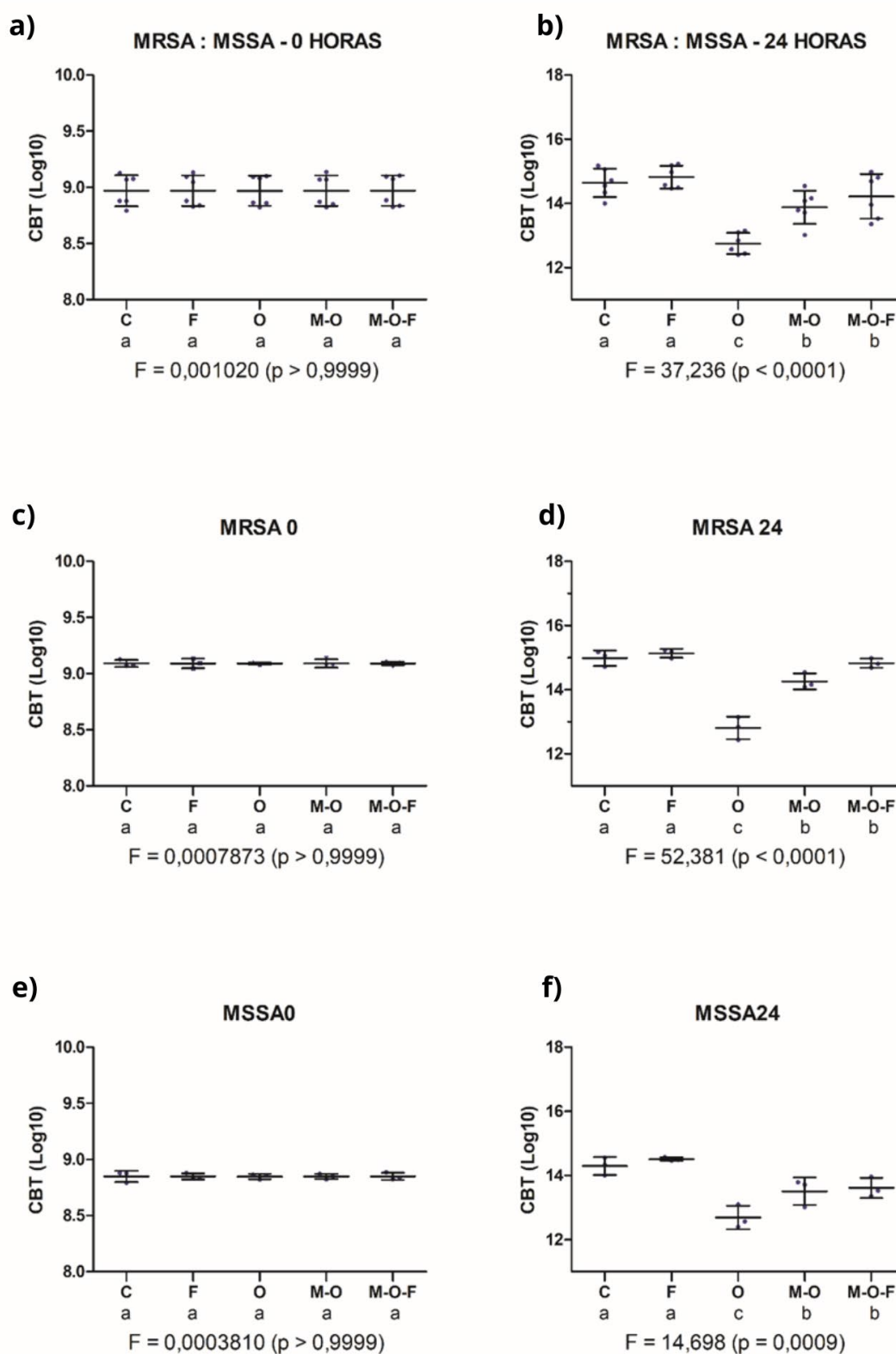
$$g = \frac{t}{n}^{25}.$$

Para todas as análises considerou-se um nível de significância (a) de 5%²⁶. Todas as análises foram realizadas nos programas GraphPad Prism v.5.01, GraphPad InStat v.3.06.

RESULTADOS

Observou-se efeito significativo entre os tratamentos avaliados. O grupo controle foi utilizado como referência para comparação dos dados. Na análise da contagem bacteriana total do *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA), os grupos controle e fibrina apresentaram valores elevados, sem diferenças estatisticamente significativas entre si. O tratamento com óxido de zinco isolado promoveu redução acentuada da contagem bacteriana, constituindo o resultado

404 mais expressivo entre os grupos testados. As combinações membrana + óxido de
405 zinco e membrana + fibrina + óxido de zinco também reduziram a contagem total,
406 porém em menor quantidade quando comparadas ao óxido de zinco isolado. Para o
407 MRSA, o grupo tratado com fibrina apresentou contagem bacteriana elevada,
408 semelhante ao controle. O óxido de zinco isolado demonstrou excelente
409 desempenho, com redução estatisticamente significativa. As combinações
410 membrana + óxido de zinco e membrana + fibrina rica em plaquetas (M+FRP) +
411 óxido de zinco apresentaram efeito significativo ($p < 0,0001$) na diminuição da
412 contagem bacteriana, diferindo estatisticamente do grupo controle. (Fig 4).



413

414 Figura 4 – Análise da contagem bacteriana total (CBT) – a) Contagem bacteriana
 415 para MSSA e MRSA 0h; b) Contagem bacteriana para MSSA e MRSA 24h; c)
 416 Contagem bacteriana MRSA 0h; d) Contagem bacteriana MRSA 24h; e) Contagem
 417 bacteriana MSSA 0h; f) Contagem bacteriana MSSA 24h.

A análise do número de gerações bacterianas apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Em todas as avaliações, o óxido de zinco isolado foi o tratamento mais eficaz, diminuiu de maneira consistente o número de gerações. Inicialmente, como MRSA é uma cepa padrão e MSSA uma cepa de campo, o número de gerações maior para MRSA pode ser justificado pelo número de passagens menor do que a cepa de campo. Porém, ao se observar as comparações com os demais grupos, observa-se o real efeito dos tratamentos. O tratamento membrana + óxido de zinco reduziu o número de gerações, enquanto a fibrina manteve valores semelhantes ao controle. A combinação membrana + fibrina + óxido de zinco também contribuiu para redução, embora em intensidade inferior ao óxido de zinco isolado. Na cepa MSSA, o tratamento com fibrina permaneceu associado a valores elevados de gerações. Os grupos membrana + óxido de zinco e membrana + fibrina + óxido de zinco diferiram estatisticamente do controle, indicando redução significativa do crescimento bacteriano. Ainda assim, o óxido de zinco isolado manteve-se como o tratamento mais eficiente conforme Fig 5.

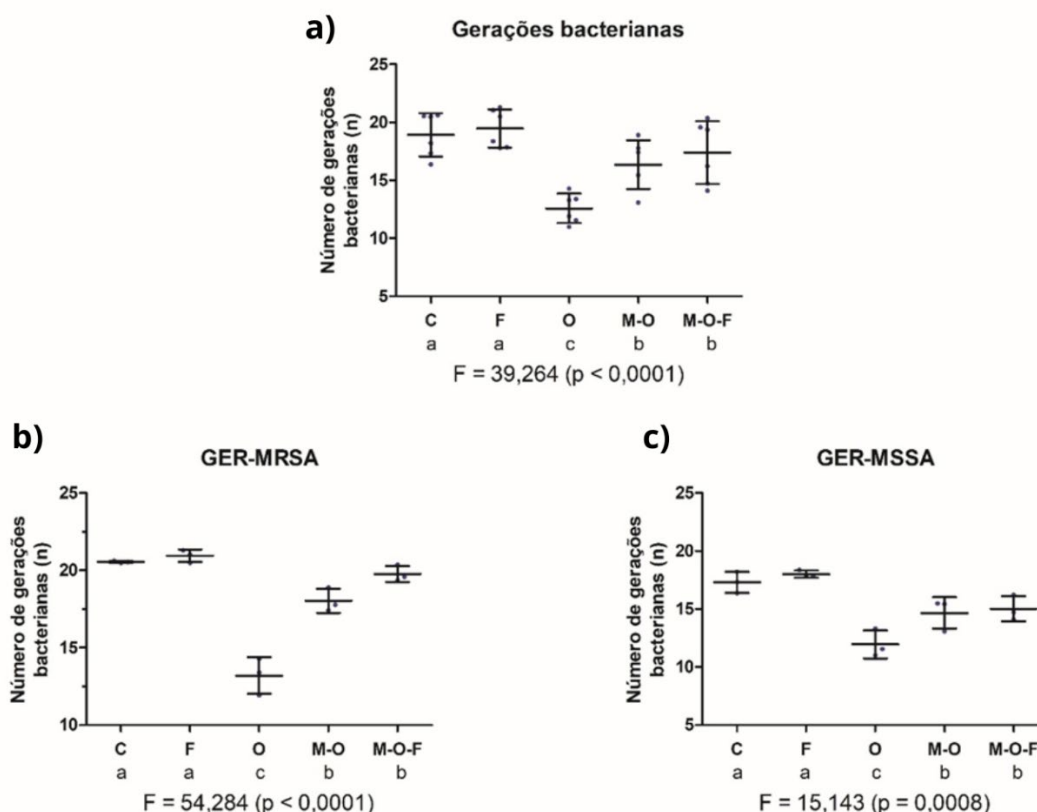


Figura 5 – Análise do número de gerações bacterianas – a) Número de gerações bacterianas para MRSA e MSSA; b) Número de gerações bacterianas MRSA; c) Número de gerações bacterianas MSSA.

A avaliação do tempo de gerações em 24h mostrou que, para a cepa MRSA, o tratamento membrana + óxido de zinco promoveu aumento desse tempo, enquanto a fibrina permaneceu semelhante ao controle. A combinação membrana + fibrina + óxido de zinco e membrana + óxido de zinco apresentou efeito intermediário, porém, o óxido de zinco isolado foi novamente o tratamento que mais aumentou o tempo de geração bacteriana, ou seja, a bactéria demorou mais tempo pra se multiplicar, refletindo forte efeito inibitório. Para MSSA, o tratamento membrana + óxido de zinco provocou leve aumento no tempo de geração, fibrina não apresentou alterações significativas, e a combinação membrana + fibrina + óxido de zinco mostrou efeito intermediário, porém ainda benéfico em relação ao controle. (Fig 6).

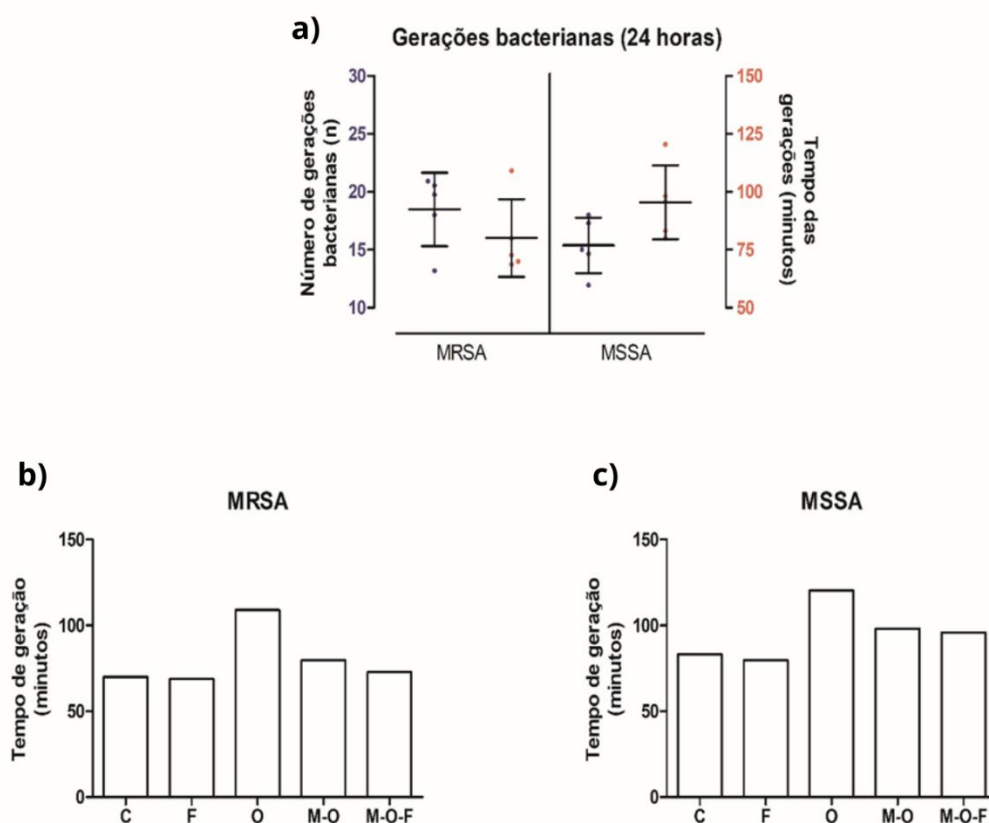


Figura 6 – Análise do tempo de gerações das bactérias em minutos – a) Número de gerações bacterianas e tempo de gerações em minutos da MRSA e MSSA; b) Tempo de gerações em minutos para MRSA; c) Tempo de gerações em minutos para MSSA.

Para as análises de porcentagem de redução de crescimento em %, o controle estava no 0, como esperado. Para MRSA, membrana + óxido de zinco e membrana + óxido de zinco + fibrina diferiram estatisticamente entre si, sendo a membrana + óxido de zinco o melhor entre eles. O óxido de zinco foi o resultado mais expressivo, diferindo de todos os tratamentos. A fibrina por sua vez teve resultado negativo, ou seja, ela estimulou o crescimento nesse contexto. Para MSSA, os resultados foram semelhantes, porém, o grupo membrana + óxido de zinco e membrana + óxido de zinco + fibrina tiveram resultados um pouco melhores para essa cepa, enquanto óxido de zinco, teve o resultado um pouco menor, mas ainda assim foi um bom resultado. A fibrina também apresentou resultado negativo para essa cepa. Mesmo submetidas ao mesmo tratamento as cepas apresentaram algumas diferenças nos resultados, mostrando diferença de comportamento de cada uma.

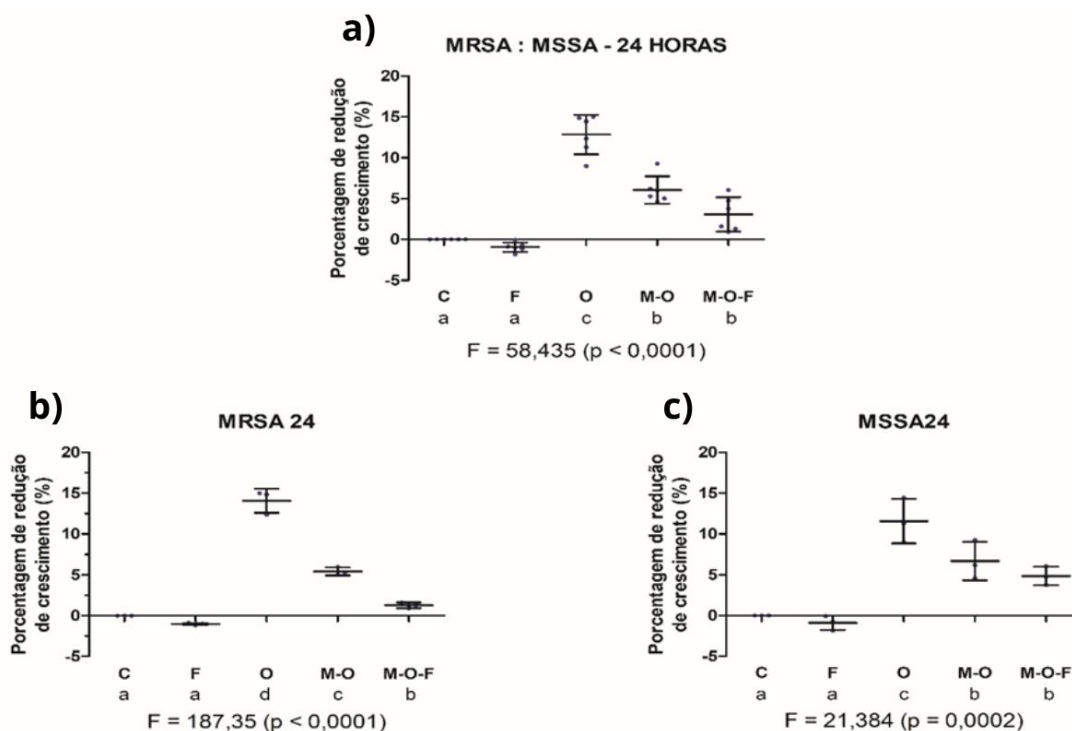


Figura 7 – Análise da porcentagem de redução de crescimento bacteriano – a) Porcentagem de redução de crescimento para MRSA e MSSA 24h; b) Porcentagem de redução de crescimento MRSA 24h; c) Porcentagem de redução de crescimento MSSA 24h.

DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que as nanopartículas de óxido de zinco isoladas apresentaram o melhor desempenho, inibindo de forma mais efetiva o crescimento bacteriano e aumentando o tempo de multiplicação de *S. aureus*. Esses achados estão em concordância com os resultados descritos por Jones et al.²⁷, que avaliaram a atividade de nanopartículas de ZnO frente a diversos microrganismos, observando elevada atividade antimicrobiana. Também é relatado que as nanopartículas de ZnO demonstram maior atividade frente a bactérias Gram-positivas, o que se alinha ao presente estudo, que utilizou *S. aureus* como modelo experimental²⁸. Além disso, pesquisas demonstraram que o óxido de zinco possui ação antibacteriana e capacidade de inibir a formação de biofilme, reforçando seu potencial de interesse no combate a bactérias²⁹.

Nesse contexto, a borracha natural de látex vem sendo amplamente investigada para aplicações biomédicas por apresentar propriedades desejáveis à

cicatrização de feridas. Entre seus principais benefícios destaca-se a capacidade de induzir angiogênese⁸ permitindo formação de novos vasos sanguíneos e fornecendo nutrientes essenciais para o processo de reparação tecidual³⁰.

Estudos têm buscado associar o ZnO à membrana de látex para potencializar seus efeitos, principalmente em relação à inibição bacteriana. No presente trabalho, a membrana de látex impregnada com óxido de zinco apresentou resultados satisfatórios, com diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle, corroborando os achados de Masa et al.,³¹ que avaliaram espuma de látex contendo ZnO impregnado com prata, observando ampliação da zona de inibição bacteriana e redução da carga microbiana, sem alterar a estrutura do látex natural. A membrana de látex também apresenta a vantagem de promover a liberação controlada de fármacos³² característica importante em feridas extensas ou infectadas, que demandam tratamentos de longa duração. Assim, a associação desses biomateriais se mostra promissora por permitir ação prolongada e potencialmente mais eficaz para o tratamento da ferida.

Outro biomaterial utilizado foi a fibrina rica em plaquetas (FRP). A FRP consiste em uma matriz tridimensional composta por plaquetas, neutrófilos e macrófagos em elevada concentração, resultante de um processo de centrifugação que preserva uma arquitetura fibrilar densa e organizada³³. Essa matriz é capaz de liberar gradualmente fatores de crescimento, favorecendo processos de reparo tecidual³⁴.

De acordo com o estudo de Kour et al.,³⁵ a FRP injetável apresentou maior efeito antimicrobiano quando comparada ao plasma rico em plaquetas e ao plasma rico em fibrina. De forma semelhante, Badade et al.,³⁶ observaram que, frente a bactérias Gram-negativas, o plasma rico em plaquetas (PRP) apresentou maior capacidade de inibição bacteriana do que o PRF, evidenciando variações na eficácia antimicrobiana entre os diferentes concentrados plaquetários.

Esses achados estão alinhados com os resultados do presente estudo, no qual a fibrina rica em plaquetas não demonstrou atividade antimicrobiana significativa frente às bactérias testadas. Além disso, na análise da porcentagem de redução do crescimento, a FRP apresentou efeito negativo, sugerindo até mesmo estímulo ao crescimento bacteriano.

Os fatores de crescimento das plaquetas encontram-se armazenadas nos grânulos, alfa, delta e lambda, sendo liberadas por exocitose após a ativação

522 plaquetária. A ativação das plaquetas ocorre logo após o contato do sangue com a
523 parede do tubo, promovendo a formação de uma rede densa de fibrina. Dessa
524 forma, o intervalo entre a coleta sanguínea e a centrifugação deve ser o mais curto
525 possível, a fim de evitar a ativação precoce dos grânulos antes de sua aplicação³⁷.
526 Adicionalmente, o intervalo entre a coleta sanguínea e a centrifugação configura-se
527 como um fator crítico que pode ter influenciado os resultados obtidos.

528 Esses resultados reforçam que a atividade antimicrobiana da FRP pode ser
529 limitada, dependendo da forma de aplicação, das características do microrganismo
530 avaliado, do tempo de preparo, entre outros.

531 Embora os achados *in vitro* desse estudo sejam promissores, faz-se
532 necessário aprofundar a investigação por meio de estudos *in vivo*, especialmente em
533 modelos de feridas contaminadas em animais. Tais abordagens permitirão avaliar
534 não apenas a eficácia bactericida *in vitro*, mas também aspectos relacionados à
535 biocompatibilidade, resposta inflamatória, regeneração tecidual e segurança do uso
536 clínico. No caso da FRP, ela pode apresentar melhores resultados quando testada
537 diretamente em feridas, pois ela possui características desejáveis na reparação de
538 tecidos. Assim, este trabalho contribui como base para o desenvolvimento de futuras
539 pesquisas que explorem a aplicabilidade desses biomateriais no tratamento de
540 feridas.

542 CONCLUSÃO

543 A hipótese inicial do estudo propunha que a associação entre fibrina rica em
544 plaquetas, membrana de látex e nanopartículas de óxido de zinco resultaria em
545 aumento da atividade antibacteriana contra o crescimento de MRSA e MSSA. Os
546 resultados, entretanto, demonstraram que o óxido de zinco isolado apresentou maior
547 atividade antibacteriana, enquanto as combinações com membrana de látex e fibrina
548 mostraram efeitos intermediários. Dessa forma, a hipótese de aumento da atividade
549 antibacteriana foi parcialmente aceita, não havendo potencialização da ação
550 antibacteriana, mas as associações deve ser consideradas pelas propriedades
551 complementares relevantes do biomaterial para a cicatrização, com sua liberação
552 controlada. Por se tratar de um estudo *in vitro*, são necessários experimentos *in vivo*
553 para observar o comportamento dos biomateriais diretamente em feridas,
554 comprovando a eficácia clínica e aplicabilidade dos materiais.

FRP e látex com óxido de zinco contra *S. aureus*

→ Biomateriais testados (grupos)



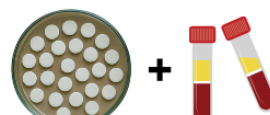
ZnO



FRP

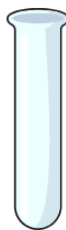


M+ZnO



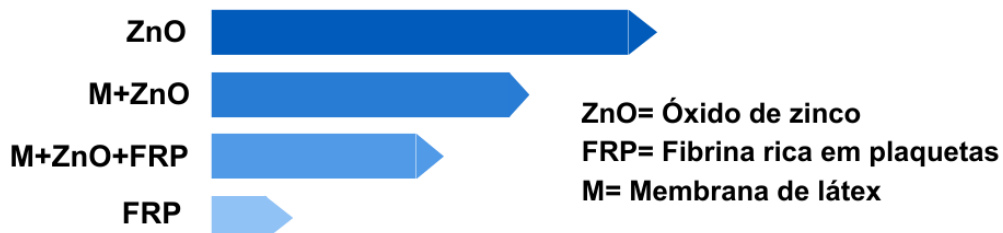
M+ZnO+FRP

→ Estudo *in vitro*



- Contagem bacteriana total
- Número de gerações bacterianas
- Tempo de gerações
- % de redução de crescimento

→ Resultados



O óxido de zinco apresentou a melhor atividade antimicrobiana, seguido pela membrana de látex impregnada com óxido de zinco e, subsequentemente, pela combinação da membrana com fibrina.

REFERÊNCIAS

1. T. Subramaniam, MH. B. Fauzi, Y. Lokanathan, J. X. Law, "The role of calcium in wound healing," *International Journal of Molecular Sciences* 22 (2021):6486.
2. PH. Wang, BS. Huang, HC. Horng, CC. Yeh, YJ. Chen, "Wound healing," *Journal of the Chinese Medical Association* 81 (2018): 94–101.
3. A.W. Chang, S.E. Dowd, G. Brackee, J.A. Fralick, G. VEDIYAPPAN, "Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by gurmarin, a plant-derived cyclic peptide," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (2022): 1017545.
4. S. Y.C. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, V. G. Fowler Jr, "Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management," *Clinical Microbiology Reviews* 28 (2015):603–661.
5. F. D. Lowy, "Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*," *Journal of Clinical Investigation* 111 (2003):1265–1273.
6. P. A. C. Marques, N. B. Guerra, L. S. Santos, C. U. Mussagy, G. S. P. Brasil, B. S. Burd, et al., "Natural rubber latex-based biomaterials for drug delivery and regenerative medicine: trends and directions," *International Journal of Biological Macromolecules* 267 (2024):131666.
7. N.R. Barros, S. Ahadian, P. Tebon, M.V.C. Rudge, A.M.P. Barbosa, R. D. Herculano, "Highly absorptive dressing composed of natural latex loaded with alginate for exudate control and healing of diabetic wounds," *Materials Science and Engineering: C* 119 (2021): 111589.
8. N. B. Guerra, G. S. Pegorin, M. H. Boratto, N. R. Barros, C. F. O. Graeff, R. D. Herculano, "Biomedical applications of natural rubber latex from the rubber tree *Hevea brasiliensis*," *Materials Science and Engineering: C* 121 (2021):112126.
9. R. Dimitriou, G. L. Mataliotakis, G. M. Calori, P.V. Giannoudis, "The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence," *BMC Medicine* 10 (2012): 81.
10. D. C. Zancanela, C. S. Funari, R. D. Herculano, V. M. Mello, C. M. Rodrigues, F. A. Borges, et al., "Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: physical-chemistry and antimicrobial behaviours," *Materials Science and Engineering: C – Materials for Biological Applications* 97 (2019):576–582.
11. P. Pati, S. McGinnis, P. J. Vikesland, "Life cycle assessment of "green" nanoparticle synthesis methods," *Environmental Engineering Science* 31 (2014):410–420.

- 597 12. S. Jha, R. Rani, S. Singh, "Biogenic zinc oxide nanoparticles and their biomedical
598 applications: a review," *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and*
599 *Materials* 33 (2023): 4051–4068.
- 600 13. É. J. Guidelli, A. Kinoshita, A. P. Ramos, O. Baffa, "Silver nanoparticles delivery
601 system based on natural rubber latex membranes", *Journal of Nanoparticle Research*
602 15 (2013):1597.
- 603 14. L. S. Reddy, M. M. Nisha, M. Joice, P. N. Shilpa, "Antimicrobial activity of zinc
604 oxide (ZnO) nanoparticle against *Klebsiella pneumoniae*," *Pharmacognosy Magazine*
605 10 (2014):1388–1397.
- 606 15. TH. A. Singh, A. Sharma, N. Tejwan, N. Ghosh, J. Das, P. C. Sil, "A state of the
607 art review on the synthesis, antibacterial, antioxidant, antidiabetic and tissue
608 regeneration activities of zinc oxide nanoparticles," *Advances in Colloid and Interface*
609 *Science* 295 (2021):102495.
- 610 16. C. H. Park, K.M. Woo, "Fibrin-based biomaterial applications in tissue
611 engineering and regenerative medicine," *Biomimetic Medical Materials: From*
612 *Nanotechnology to 3D Bioprinting* (2018): 253–261.
- 613 17. K. Ozer, O. Colak, "Leucocyte- and platelet-rich fibrin as a rescue therapy for
614 small-to-medium-sized complex wounds of the lower extremities," *Burns Trauma* 7
615 (2019):11.
- 616 18. Y. Fan, K. Perez, H. Dym, "Clinical uses of platelet-rich fibrin in oral and
617 maxillofacial surgery," *Dental Clinics of North America* 64 (2020): 291–303.
- 618 19. M. F. Festing, "Guidelines for the design and statistical analysis of experiments in
619 papers submitted to ATLA" *Alternatives to Laboratory Animals* 29 (2001): 427-46.
- 620 20. G. D. da Silva, J. R. Tamashiro, B. L. Martins, G. M. Q. Fernandes, M. R. M.
621 Chaves, R. H. Pires, A. Kinoshita, "Improved gypsum plaster by incorporation of zinc
622 oxide nanoparticles (ZnO-NPs)," *Journal of Materials Science* 57 (2022): 2697-2709.
- 623 21. J. R. Tamashiro, I. S. Lima, F. F. G. Paiva, L. H. P. Silva, D. V. M. Oliveira, O.
624 Baffa, A. Kinoshita, "Treatment of Sugarcane Vinasse Using Heterogeneous
625 Photocatalysis with Zinc Oxide Nanoparticles," *Sustainability* 14 (2022):16052.
- 626 22. M. K. Shukla, R. P. Singh, C. R. K. Reddy, B. Jha, "Synthesis and
627 characterization of agar-based silver nanoparticles and nanocomposite film with
628 antibacterial applications," *Bioresource Technology* 107 (2012): 295-300.
- 629 23. N. M. Al-Hada, M. B. Ahmad, T. S. Jamil, A. A. H. Kadhum, A. B. Mohamad, J.
630 Salimon, "The influence of calcination temperature on the formation of zinc oxide
631 nanoparticles by thermal treatment," *Applied Mechanics and Materials* 446-447
632 (2013): 181-4.

24. H. Li, B. Li, "PRP as a New approach to prevent infection: preparation and in vitro antimicrobial properties of PRP," *Journal of Visualized Experiments* 74 (2013).
25. P. R. Murray, K. S. Rosenthal, G. S. Kobayashi, M. A. Pfaller, "*Microbiologia médica*," Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (1992): 513.
26. M. F. Triola, "*Introdução à estatística*," 14^a ed. Rio de Janeiro: LTC; 2024. 768 p.
27. N. Jones, B. Ray, K. T. Ranjit, A. C. Manna, "Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms," *FEMS Microbiology Letters* 279 (2008): 71-76.
28. G. R. Navale, M. Thripuranthaka, D. J. Late, S. S. Shinde, "Antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against pathogenic bacteria and fungi," *JSM Nanotechnology Nanomedicine* 3 (2015): 1033.
29. V. Vinotha, A. Iswarya, R. Thaya, M. Govindarajan, N. S. Alharbi, S. Kadaikunnan, et al., "Synthesis of ZnO nanoparticles using insulin-rich leaf extract: Anti-diabetic, antibiofilm and anti-oxidant properties," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2019): 111541.
30. R. J. Mendonça, V. B. Maurício, L. B. Teixeira, J. J. Lachat, J. C. Netto, "Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*," *Phytotherapy Research* 24 (2010): 764-768.
31. A. Masa, N. Jehsoh, S. Dueramae, N. Hayeemasae, "Boosting the Antibacterial Performance of Natural Rubber Latex Foam by Introducing Silver-Doped Zinc Oxide," *Polymers* 15 (2023): 1040.
32. R. D. Herculano, C. E. Reis, S. M. B. Souza, G. S. P. Brasil, M. Scontri, S. Kawakita et al., "Amphotericin B-loaded natural latex dressing for treating *Candida albicans* wound infections using *Galleria mellonella* model," *Journal of Controlled Release* 365 (2024): 744-758.
33. D. M. D. Ehrenfest, M. D. Corso, A. Diss, J. Mouhyi, J. B. Charrier, "Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane," *Journal of Periodontology* 81 (2010):546-55.
34. E. Kobayashi, L. Flückiger, M. F. Kobayashi, K. Sawada, A. Sculean, B. Schaller, et al., "Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF," *Clinical Oral Investigations* 20 (2016): 2353–2360.
35. P. Kour, P. S. Pudakalkatti, A. M. Vas, S. Das, S. Padmanabhan, "Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of platelet-rich plasma, platelet-rich fibrin, and

injectable platelet-rich fibrin on the Standard Strains of Porphyromonas gingivalis and
Aggregatibacter actinomycetemcomitans,” *Contemporary Clinical Dentistry* 9 (2018):
S325-30.

36. P. S. Badade, S. A. Mahale, A. A. Panjwani, P. D. Vaidya, A. D. Warang,
“Antimicrobial effect of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrina,” *Indian Journal of
Dental Research* 27 (2016): 300-4.

37. Z. Mihaylova, V. Mitev, P. Stanimirov, A. Isaeva, N. Gateva, N. Ishkitiev, “Use of
platelet concentrates in oral and maxillofacial surgery: an overview,” *Acta
Odontologica Scandinavica* 75 (2017): 1-11.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROBIC: sem bolsista (Programa de Bolsa de Iniciação Científica)

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito bactericida da fibrina rica em plaquetas (FRP) e membrana de látex impregnada com óxido de zinco em bactérias *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA) e *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA): estudo in vitro utilizando teste kill curve", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o nº 9623 e tendo como participante(s) CARLA MUNHOZ MARIS (discente), CAMILA RONCADA RAMOS (discente), LILIANE VOLTARELLI FURINI (discente), ANGELA MITIE OTTA KINOSHITA (docente colaborador), RODRIGO COSTA DA SILVA (docente colaborador), CECILIA LAPOSY SANTAREM (docente responsável), foi avaliado e Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), Comissão de Ética Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

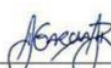
Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido Aprovado em reunião realizada em 11/06/2025 00:00:00.

Vigência do projeto: 08/2025 a 07/2026.

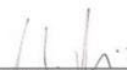
ANIMAL VIVO

Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Canina-Canis lupus familiaris	4	10,00 quilos	4 anos	M	Atendimento ambulatorial

Presidente Prudente, quarta-feira, 12 de novembro de 2025.


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


Profa. Dra. Fernanda Pataro Marsola Razera
Coordenadora do CEP - UNOESTE


Prof. Dr. Felipe Rydygier de Ruediger
Coordenador da CEUA - UNOESTE

ANEXO B - NORMAS DA REVISTA VETERINARY DERMATOLOGY

1. GENERAL COMMENTS, AIMS, SCOPE

Veterinary Dermatology is a bi-monthly, peer-reviewed, international journal which publishes papers on all aspects of the skin of mammals, birds, reptiles, amphibians and fish such as:

- Skin structure (anatomy, histology, ultrastructure)
- Skin function (physiology, biochemistry, pharmacology, immunology, genetics)
- Skin ecosystem, microbiology and parasitology relevant to skin
- Dermatopathology
- Pathogenesis, diagnosis and treatment, including prophylaxis, of skin diseases
- New skin disease entities

The journal is available online and as hardcopy and publishes:

- Original articles
- Brief communications
- Clinical case reports
- Invited reviews
- Education articles (e.g. "Clinical Techniques", "Histopathology Corner")
- Letters, book reviews and editorials

Submission to *Veterinary Dermatology* implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief (maximum 250 word) abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium. Studies reporting negative results (i.e. null hypothesis cannot be rejected) will also be considered providing the study design is sufficiently robust relevant to the journal.

In view of the substantial advances in the area of wounds and wound healing products, we would like to suggest that these are submitted to journals more specialised in these topics. We will consider high-quality papers that deal with spontaneous cutaneous wounds in domestic animals (i.e. those occurring after routine/necessary surgical procedures) and studies of post-surgical wound infections. We discourage submissions involving laboratory animal studies involving wounds and those where wounds (surgical, thermal or caustic) have been created for the sole purposes of the research.

2. SUBMISSIONS

New submissions should be made via the Research Exchange submission portal <https://wiley.atyponrex.com/journal/VDE>. Should your manuscript proceed to the revision stage, you will be directed to make your revisions via the same submission portal. You may check the status of your submission at any time by logging on to [submission.wiley.com](https://www.wiley.com) and clicking the "My Submissions" button. For

technical help with the submission system, please review our [FAQs](#) or contact submissionhelp@wiley.com.

Submissions via the new Research Exchange portal can be uploaded either as a single document (containing the main text, tables and figures), or with figures and tables provided as separate files. Should your manuscript reach revision stage, figures and tables must be provided as separate files. The main manuscript file should be submitted in Microsoft Word (.doc or .docx) formats.

3. MANUSCRIPT TYPES

The requirements for each manuscript type are described below and summarised in the table with more specific recommendations on manuscript preparation and formatting under [section 4](#)

Original Articles are original experimental or observational studies that present novel results and conclusions or advances within the scope of this journal. Articles have a separate structured abstract of up to 250 words, followed by up to six keywords, then Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References and in some cases Supporting information. Articles should be no longer than 4000 words, excluding title page, abstract, figure and table legends, acknowledgements, and references, and they can include six display items (figures or tables). Additional information can be published as Supporting Information (online only) but may not undergo the same copyediting processes by the editorial team.

Brief Communications report novel or important findings or clarifications in a concise format. The text (excluding title page, abstract and references) is limited to 1500 words with up to 12 references. For some manuscripts the editors may ask to reduce the word count to 750 and up to six references. Up to four display items (figures or tables) can be included.

Case Reports will only be considered for publication if they add new and useful information for the discipline of veterinary dermatology. Reports of novel treatments or diagnostic techniques are unlikely to be considered unless a sufficiently large number of cases have been studied to provide reasonable insight into effectiveness and possible harms. Cases of skin infection due to pathogens with new species names where the terminology may have changed due to wider availability of molecular laboratory methods, but which otherwise follow a previously reported pathology, diagnostic work-up and treatment, are unlikely to be considered. Consideration will be given to reports:

- of new diseases or conditions, or of variations on recently described diseases
- of novel infectious diseases that are of zoonotic importance or are highly contagious
- that will make a significant change in how a disease is diagnosed or treated.

800 Authors should note that fewer than 33% of case report submissions are ultimately
801 accepted for publication.

802 The word limit for all case reports is 1500 words (750 may be advised by an editor),
803 excluding title page, abstract, acknowledgement and references. The main text must
804 focus solely on novel key information provided by the case(s). Relevant additional
805 information may be submitted as Supporting Information (published online, not in
806 print). Such Supporting Information may for example include detail of diagnostic
807 procedures or treatment that can generally be considered as widely accepted in
808 veterinary dermatology practice or a chronological description of progress. Up to four
809 display items (figures or tables) can be included. No more than six references are
810 recommended, but up to twelve may be acceptable at the editor's discretion. Small
811 case series (less than 5 cases) should be submitted in the format of Case Reports. A
812 larger case series may be submitted as an Original Article, but authors should
813 contact the journal's Editorial Office for guidance prior to submission with any
814 questions about suitability.

815 **Letters to the Editor** providing comments on previously published papers or seeking
816 to generate discussion or awareness of a developing area are welcomed. Comments
817 on previously published papers should be confined to the substance of the paper and
818 the authors of the paper referred to will be offered the opportunity to respond. If the
819 authors do not want to provide a response, or do not provide a response within 30
820 days, an Editor's footnote will be added to the published Letter to the Editor (e.g.,
821 "The authors of [title of previously published paper] offered no comments".) Letters
822 should only present new data if the data supports a comment raised about the paper
823 referred to. Authors who would like to present new data should submit as a Brief
824 Communication instead.

825 The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of
826 interest. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. It is the
827 responsibility of the corresponding author to review the journal's conflict of interest
828 policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent
829 commercial and other relationships. If the author(s) have no conflicts of interest to
830 declare, this must also be stated.

831 Letters will be limited to 750 words, including references, and up to two display items
832 (figure or table).

833 **Review articles** are by invitation from the Editor-in-Chief and after approval from the
834 editorial team. The structure will vary depending on content, but manuscripts should
835 not exceed 6000 words unless agreed with the editors before submission. Authors
836 wanting to propose a topic for review or to submit a review article should contact the
837 Editor-in-Chief (via VDEedoffice@wiley.com) with a brief description of the article
838 and outline.

839 **Book reviews** will be invited by the editors. Books proposed for review can be
840 discussed with the editors.

841 **Education articles** are articles such as "Clinical Techniques", "Histopathology
842 Corner" or editorials. They are by invitation from the editors and advice on formatting

843 will be provided as appropriate for the topic. During the submission process, please
 844 upload as 'Education'.

845 Summary of manuscript structure

	Abstract	Word limit	Display items (figures or tables)	References
Original article	Structured and up to 250 words	4000* (or as discussed with the editors)	Around 6	Typically no more than 50
Brief communication	Structured and up to 250 words	1500* (750 may be advised by an editor)	Up to 4	Up to 12, six if 750 words
Case report	Narrative and up to 50 words	1500* (750 may be advised by an editor)	Up to 4	Up to 12, six if 750 words
Letter to the Editor	None	750 (including title and references)	Up to 2	Up to 6
Review – by invitation	Can be truncated or structured and up to 250	Up to 6000* (or as discussed with the editors)	As appropriate	As appropriate
Book review	Information provided by the editors 'Clinical Techniques' or 'Histopathology Corner' feature articles. By invitation. Information on formatting will be provided by the editors depending on topic of the article. During the submission process, please upload as 'Education'			
Education articles				

*excluding title page, abstract, figure and table legends, acknowledgement and references

For all types of contributions, relevant **Supporting information** containing additional text and figures may be allowed. All Supporting information should be referenced in the text. It will be peer reviewed but only published online. Supporting information, if extensive, may not undergo the journal's full copyediting process, primary responsibility for clear formatting lies with the authors and editors may ask the authors to edit the material prior to publication.

www.wiley.com/go/nihmandate

4. ETHICS REQUIREMENTS FOR STUDIES INVOLVING ANIMALS

All material published in *Veterinary Dermatology* must adhere to **high ethical standards on animal welfare** as set out by the International Association of Veterinary Editors (IAVE), available at <http://www.veteditors.org/consensus-author-guidelines-on-animal-ethics-and-welfare-for-editors/>

Authors are responsible for including information on provision of best practice and animal welfare in the manuscript and – if requested by the editors – provide evidence for compliance with these requirements prior to peer review or publication.

For all studies involving invasive procedures, analgesia, sedation and/or anaesthesia must always be used as appropriate and such use must be clearly described. The Editors retain the right to reject manuscripts when, in their opinion, studies involved unnecessary pain, distress, suffering or lasting harm to animals or where the relevant guidelines were not followed. In addition, the Editors would not normally support publication of experiments resulting in euthanasia. They will collaborate, if required, with institutions and other organizations that investigate cases of suspected research misconduct following: [COPE guidance](#).

Which animal studies require ethical oversight?

For the purpose of publishing in *Veterinary Dermatology*, ethical considerations and their inclusion in a manuscript are required for:

- Clinical studies involving **client-owned animals** if the study design classifies a study as research (e.g. if animals are randomised into groups). Ethical oversight and approval are required even if the outcome of the study (e.g. the efficacy of a new treatment, or accuracy of a diagnostic tests) is either for the direct benefit of the animals under treatment, or their immediate group. Ethical approval is NOT required if established internationally recognised high standards ("best practice") of individual veterinary patient care were followed.
- All studies on **experimental animals** where there is no direct benefit to the animals or their immediate group and where the procedures used may cause pain, suffering, distress or lasting harm. Animals used for these scientific purposes are protected by national legislation and/or regulations.

- *In vitro* studies using **tissue** from animals or humans (e.g. skin biopsy samples, serum, faeces) where the origin of samples needs to be confirmed as compliant with requirements for “best practice” or ethics guidelines.
- Studies using non-invasive procedures (e.g. swabbing for microbial skin carriage) if **personal identifiable data from owners** were collected during the study (informed verbal or written consent will be a minimum requirement for publication).
- Research where the results, even if obtained by non-invasive methods (e.g. work done on swab, faecal, serum samples), may have **implications for human health**, e.g. for studies screening for zoonotic pathogens, how was the reporting of results communicated to owners?

Authors are asked to:

1. **At submission,**

- **confirm** that animal use was conducted in accordance with international, national and institutional guidelines for the humane treatment of animals, and in compliance with relevant legislation
- Provide the name of any **approving body, institutional reference number** or **approved protocol number** where applicable
- **confirm** that **written consent** was obtained from animal owners for studies using privately/client-owned animals (or declare that this was not required for their study).

2. **Include in the ‘Materials and Methods’ section of the manuscript,**

- a statement on whether ethical considerations were required for the study
- if yes, include as the first paragraph of the ‘Materials and Methods’ section under the subheading “**Ethics**” sufficient detail on the ethics review and approval to allow assessment of the process. The section needs to include that **written informed owner consent** was obtained.

Specific comments on what is required

Client/private-owned animals: all studies to be considered for publication in *Veterinary Dermatology* must have followed internationally recognized “**best clinical practice**” standards for veterinary patient care and procedures must be described in the ‘Materials and Methods’ section (first subheading “Ethics”). Authors need to describe how the institutional, national and/or international guidelines were met (including name of approving body and **institutional**), and details of how animal welfare standards/best veterinary practice standards were met (names of ethical oversight bodies need to be hidden for confidentiality until acceptance as for other identifiers in the manuscript). Authors must ensure that owner consent for use of images has been given where animals may be identifiable.

- Where veterinary interventions went **beyond “best clinical practice” for individual patients**, approval by an institutional ethics review/oversight committee will be required and authors must be able to confirm that informed, appropriately worded written consent had been obtained from animal owners prior to study begin.

- The description in the manuscript needs to include how **owners' confidentiality** was ensured.
- Where an institutional ethics review/oversight board is not directly accessible to authors, a moral obligation of achieving these standards remains and other arrangements must be made for this to take place **before study begin**. **Authors working in private practice** are encouraged to seek suitable external assessment from national professional organisations, e.g.
 - by consulting with and involving a colleague with relevant experience at a reputable institution or a university or veterinary school with access to an oversight committee.
 - in the UK, clinicians who wish to conduct clinical trials, and do not have access to a university ethical review, may submit study plans to the Royal College of Veterinary Surgeons for review by its ethical review panel <https://www.rcvs.org.uk/who-we-are/committees/ethics-review-panel/> For example, by the ethical review committee at a reputable institution such as a university or veterinary school.
- By recruiting the oversight of an *ad hoc* ethical committee. Detail must be provided in the manuscript on the nature of an *ad hoc* committee used (and which must have included at least some individuals independent of the institute(s)/clinic(s) involved in the work.
- As a minimum requirement, authors will be asked to discuss with the editors (and describe in the Methods) that they have searched for suitable external assessment and that their research was conducted in a manner likely to be approved by ethics committees/boards in most countries.

All research involving **experimental animals** submitted for publication must be approved by an ethics committee with oversight of the facility in which the studies were conducted and be compliant with national regulations. Also, several internationally accepted guidance documents are available and should be followed:

- The international Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (1985) from the Council for International Organizations of Medical Sciences, available at <https://cioms.ch/shop/product/international-guiding-principles-for-biomedical-research-involving-animals-2/> (or from the Executive Secretary CIOMS, c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland)
- For planning of animal experiments the PREPARE guidance and for reporting of animal research the ARRIVE guidance as detailed in the links below:
 - PREPARE (Planning Research and Experimental Procedures on Animals): Recommendations for Excellence) guidelines: <https://norecopa.no/prepare>
 - PREPARE checklist: https://norecopa.no/media/7864/prepare_checklist_english.pdf
 - ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines: <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines> . These were developed by the NC3Rs to improve standards of reporting and ensure that the data from animal experiments can be fully evaluated and utilised.

- ARRIVE checklist: [https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Guidelines/NC3Rs%20ARRIVE%20Guidelines%20Checklist%20\(fillable\).pdf](https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Guidelines/NC3Rs%20ARRIVE%20Guidelines%20Checklist%20(fillable).pdf)
- For the reporting of randomised controlled trials (RCTs) in pet dogs and cats, the PetSORT guidance:
 - The standards of reporting randomized trials in pets (PetSORT): Methods and development processes (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2023.1137774/full>)
 - The standards of reporting trials in pets (PetSORT): Explanation and elaboration (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2023.1137781/full>)
- If authors are from within the **EU**, the ethical and welfare standards of the work must at least reach those required by the Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. Text with EEA relevance: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32010L0063> . Within this Directive (under Article 49), Member States are asked to establish national committees for the protection of animals used for scientific purposes to exchange information on the operation of animal welfare bodies and project evaluation and share best practice within the Union. Links to already established authorities are included for many countries: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/nc_en.htm
- For the **UK** in particular, authors need to conform to UK legislation under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations (SI 2012/3039): <https://www.legislation.gov.uk/ukpga/1986/14/contents>
- Authors from the **USA** should cite compliance with US Institutional Animal Care and Use Committees (or IACUCs)(See: <https://www.aalas.org/iacuc>) as applicable. Specifically, experiments and clinical trials should be carried out in accordance with the Guidelines by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595115>) and <https://olaw.nih.gov/guidance/fags>
- For authors from countries where an ethical review/oversight body is not readily available, this should be stated and the nature of alternatives sought, e.g. of an ad hoc committee used for this purpose should be described (which must have included at least some individuals independent of the institute(s)/clinic(s) involved in the work).

5. RECOMMENDATIONS FOR MANUSCRIPTS DESCRIBING MICROBIOLOGY STUDIES

In light of the substantial advancements in microbiology techniques, their wide availability nowadays and the new molecular insights into the relatedness of bacterial isolates, we provide some additional guidance here for studies involving common skin pathogens (particularly staphylococci, *Pseudomonas aeruginosa*, *Malassezia pachydermatis*). Please consider them carefully, they are intended to help increase the quality of study findings and improve the chances of manuscript acceptance.

- **General advice** on studies involving microbial isolates:

- The description of laboratory methods needs to be robust and detailed enough for somebody to repeat the study you are describing, and appropriate references must be provided.
- Bacteria should be identified to the species level, using a validated/approved method (e.g. Vitek, MALDI). Biochemical tests may be appropriate for some species but molecular methods or mass-spectrometry are required to reliably differentiate members of the *S. intermedius* group (SIG).
- Including a microbiologist in the study and in manuscript writing will be beneficial.
- Isolates should be archived in case further analysis is requested by reviewers/editors.
- Routine bacterial culture procedures should follow CLSI/EUCAST guidelines. When these performance standards are followed and referenced, detailed reporting of the methods is not necessary.

When testing antimicrobial susceptibility of bacterial isolates, please assure that any reference documentation is cited correctly (for more detailed guidance see Schwarz S et al. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. Vet Microbiol. 2010;141:1-4). For example when citing a CLSI performance standards document, please note that standards are to be used in an unmodified form (in contrast to 'guidelines' which can be used as written or modified by the user to fit specific needs) For more detail see Schwarz S et al. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. Vet Microbiol. 2010;141:1-4.

- ***In vitro*** studies evaluating **antimicrobial activities of novel compounds** on skin or ear isolates:

- Appropriate controls must be included in the experiment. It should be clearly mentioned whether the data is coming from biological or from technical replicates.
- Number of isolates tested: When determining MICs, studies including less than 30 isolates are unlikely to be considered for publication (CLSI. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; Approved Guideline—Fourth Edition. CLSI document M39-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014). Isolates should be of clinical relevance in the context of veterinary dermatology and of wide genetic diversity.
- Reports on a small number of isolates (e.g. <30) will be considered if they were derived from a large collection of sample and show a wide diversity of genetic lineages or novel molecular characteristics, or have been derived from a rare/uncommon animal species (eg. zoo and wildlife).
- For highly clonal organisms (e.g. meticillin-resistant staphylococci) analysis using appropriate methods should be used to demonstrate that isolates are sufficiently different to allow sound interpretation of results (e.g. a collection of 30 MRSP isolates from a single clinic is likely to be composed of few sequence types, thus limiting the quality of study results).

1070 ○ For efficacy studies of novel compounds, MICs should be performed
 1071 along with time-kill studies (or similar), taking into account anticipated
 1072 drug delivery routes. For drugs to be used by the topical route alone,
 1073 clinically relevant concentrations should be tested.

1074 • **Surveillance or prevalence** studies:

- 1075 ○ For geographically limited studies to be considered for publication,
 1076 novel specific study questions or relevant aspects such as longitudinal
 1077 trend analyses are recommended; studies including new and relevant
 1078 animal groups as populations of origin may also be of interest.
- 1079 ○ Reports on trends in AMR which include a large number of isolates or
 1080 from a larger region will be preferred to those from more limited
 1081 populations (e.g. a single hospital). *Veterinary Dermatology* will
 1082 generally not consider cross-sectional surveillance studies on AMR
 1083 from single labs if isolates represent a limited geographical area.
- 1084 ○ Methods of isolate identification and antimicrobial susceptibility testing
 1085 (AST), including interpretative criteria for AST results must be clearly
 1086 explained and adhere to commonly accepted recommendations.
- 1087 ○ Isolate collections from a clinical population should be presented with
 1088 sufficiently relevant metadata, e.g. patient signalment, prior drug
 1089 exposures, concurrent/predisposing diseases.

1090

1091

1092 **6. RECOMMENDATIONS FOR MANUSCRIPTS DESCRIBING MICROBIOME**
 1093 **STUDIES**

1094 When manuscripts which describe studies of the microbiome are submitted for
 1095 publication in *Veterinary Dermatology*, they must provide enough detail so that
 1096 another investigator could repeat the study, or that the data could be used in future
 1097 meta-analyses. Reports should contain detailed information on the four major steps
 1098 involved in conducting these studies:

- 1099 1. **Study design:** Population selection, selection of inclusion and exclusion
 1100 criteria, skin preparation
- 1101 2. **Skin sample collection:** consistent sample collection methods and sites,
 1102 blank controls
- 1103 3. **Sample processing and sequencing:** DNA extraction methods, PCR primers
 1104 and conditions, blank controls
- 1105 4. **Analysis pipeline:** pre-processing sequences, constructing OTU tables, and
 1106 annotating OTU tables)

1107 *Special considerations for reporting:*

1108 **Terminology:**

1109 The term 'microbiome' refers to ALL microbes within a habitat, as well as their genes
 1110 and metabolites encompassing broader aspects of microbes, whereas 'microbiota'
 1111 primarily refers to a collection of microorganisms within a habitat (most often related

to bacteria or fungi), with some authors using the term ‘mycobiota’ when referring to the fungal microbiota.

Power and sample size:

Considerations used in calculating power and sample size (or when forgoing a calculation) must be reported, and published data used for calculations must be referenced. To improve the power of studies with small sample sizes, non-affected anatomic sites from the same patients – ideally contralateral sites – should be included as controls. Whenever possible, study subjects should inhabit a similar environment (e.g. indoor vs. outdoor, access to grass), and if samples can be collected at the same time of the year, that is ideal since different seasons may also influence the microbiota. It is also recommended for evaluation of disease states that clinically normal “control” subjects be sampled contemporaneously and that these subjects are not cohabitating with afflicted subjects.

Approaches to reduce bias/contamination risks:

To avoid any batch bias introduced during DNA extraction, samples should be randomized so that samples from different animals and treatment/disease groups are processed together. Additionally, samples should be processed by the same individual and in a relatively short timeframe to avoid influences from environmental changes that may occur over time.

Inclusion of negative controls from the environment where sample collections were performed, including “blank swabs” or from different collection methods should be carried through DNA extraction, PCR and sequencing, as these will allow researchers to appropriately identify potential environmental/reagent contaminants.

Transparency in reporting on the sequencing and analytic pipeline:

Skin samples consistently yield a low biomass, which often requires modifications to common microbiota sequencing protocols. Therefore, complete descriptions of the sequencing and analytic pipeline must be provided for publication, including: strategies to reduce sequence run bias, use of controls and details about how contaminating sequences were identified and removed, data normalization, data validation, data analysis (including statistical methods employed and the software utilized) and the taxonomic database used for classifying the phylogeny of microbes.

For publication in *Veterinary Dermatology*, it is required that the raw sequences obtained are made available on public-facing databases. Metadata should be included in supplemental tables to allow for future meta-analyses of data drawn from multiple studies.

7. HOW TO PREPARE AND FORMAT YOUR MANUSCRIPT FOR *VETERINARY DERMATOLOGY*

On submission, authors will be prompted to:

- 1151 • use an ORCID iD (Open Researcher and Contributor ID, a unique author
1152 identifier) to help distinguish their work from that of other researchers. [Click](#)
1153 [here](#) to find out more.
- 1154 • Provide contact details and academic affiliations for all authors and identify the
1155 corresponding author. Details must match those listed on the title page (see
1156 below) which is to be submitted separately to allow blinded peer review.
- 1157 • Confirm originality and compliance with ethical requirements
- 1158 • State funding sources
- 1159 • List three recommended reviewers and can also (optional) list opposed
1160 reviewers - these suggestions will not be binding for the editors)

1161 Authors are encouraged to consult Wiley's free online guidance resources on writing
1162 for publication or language and style guides. We strongly recommend that authors
1163 familiarise themselves with *Veterinary Dermatology's* style and format by reading a
1164 recent issue of the journal online or as hard copy. Correct preparation and formatting
1165 will improve the review and publication process and help to avoid delays.

1166 All manuscripts

1167 Separate files should be submitted, as appropriate, in the following order:

- 1168 1. Title page (includes details of authors, funding, conflicts of interest,
1169 acknowledgements as detailed below)
- 1170 2. Main text file (designated Main Document during upload)
- 1171 3. Tables
- 1172 4. Figures
- 1173 5. Supporting Information

1174 Manuscripts (including references, figure and table legends) must be submitted as
1175 A4 or 8.5 x 11 inch format with 2.5 cm margins, single-spaced typed, align text left,
1176 12 point font using sans serif typeface such as Helvetica (Swiss), Arial or Verdana
1177 style (please do not use Times New Roman). Each **line and page should be**
1178 **numbered** in the manuscript text.

1179 As *Veterinary Dermatology* operates a system of double-blinded review, authors
1180 should **avoid including identifiers within the main text file**: the name of the
1181 institution at which the work was performed, initials of the authors; and must remove
1182 institution names from illustrations in order to maintain anonymity. Please include
1183 these details on the title page.

1184 In addition to anonymizing the text, please ensure document properties are also
1185 anonymized. [Document Inspector](#) helps you find and remove hidden data and
1186 personal information stored in the anonymized version of your manuscript. Here's
1187 how to use it:

- 1188 1. Open the Document Inspector: Go to File > Info > Check for Issues > Inspect
1189 Document.
- 1190 2. Inspect the Document: Select or clear the options to remove or save. Click
1191 Inspect.
- 1192 3. Review the Inspection Results: Select Remove All on any items to delete.

1193 4. Reinspect or Close: You can choose to reinspect or close the Document
1194 Inspector.

1195 *Title Page*

1196 A **Title Page** should be submitted **as a separate file** for all types of contributions. It
1197 will not be forwarded to the reviewers and should contain:

- 1198 1. A short informative title. The title should not contain abbreviations or
1199 tradenames of drugs (see Wiley's [best practice SEO tips](#));
- 1200 2. A short running title of less than 50 characters
- 1201 3. The full names of the authors;
- 1202 4. The authors' institutional affiliations where the work was conducted. Where
1203 authors have moved to different addresses since, please also provide their
1204 current address.
- 1205 5. Authors can stipulate if they share first authorship or senior authorship
- 1206 6. Acknowledgements.

1207 The **Acknowledgments** section should list contributions from anyone who does not
1208 meet the criteria for authorship, with permission from the contributor. This will include
1209 any details of writing assistance companies and who funded this.

1210 *Funding*

1211 Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are
1212 responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the
1213 Open Funder Registry for the correct
1214 nomenclature: <https://www.crossref.org/services/funder-registry/>

1215 *Authorship*

1216 The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how.
1217 All those listed as authors should qualify for authorship according to the following
1218 criteria:

- 1219 1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition
1220 of data, or analysis and interpretation of data;
- 1221 2. Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important
1222 intellectual content;
- 1223 3. Given final approval of the version to be published. Each author should have
1224 participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate
1225 portions of the content; and
- 1226 4. Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions
1227 related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately
1228 investigated and resolved.

1229 Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be
1230 listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for
1231 example, to recognize contributions from people who provided technical help,
1232 collation of data, writing assistance, acquisition of funding or a department

chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

Additional Authorship Options: Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship, a footnote should be added to the author listing, e.g. 'X and Y should be considered joint first author' or 'X and Y should be considered joint senior author.'

Author Pronouns

Authors may now include their personal pronouns in the author bylines of their published articles and on Wiley Online Library. Authors will never be required to include their pronouns; it will always be optional for the author. Authors can include their pronouns in their manuscript upon submission and can add, edit, or remove their pronouns at any stage upon request. Submitting/corresponding authors should never add, edit, or remove a coauthor's pronouns without that coauthor's consent. Where post-publication changes to pronouns are required, these can be made without a correction notice to the paper, following Wiley's Name Change Policy to protect the author's privacy. Terms which fall outside of the scope of personal pronouns, e.g. proper or improper nouns, are currently not supported.

Author Name Changes

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

Author Contributions

For all articles, the journal mandates the CRediT (Contribution Roles Taxonomy), for more information please see [Author Services](#).

Conflict of Interest Statement

Authors should provide a conflict of interest statement for each contributing author. For details on what to include in this section, see the '[Conflict of Interest](#)' section in [section 5](#) below. The submitting author must ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Study presentation: Please state if, where and when the study has been formally presented at a conference.

1270 *Main text file*

1271 The main text file should include in the following order:

- 1272 1. Title
- 1273 2. Abstract
- 1274 3. Keywords (up to six)
- 1275 4. Main text
- 1276 5. Table and Figure legends (Tables and figures should be supplied as separate
- 1277 files).
- 1278 6. References

1279 As papers are double-blind peer reviewed, the **main text file** should not include any
 1280 information that might identify the authors. Please **submit with placeholders** so that
 1281 information can be re-inserted after acceptance (and make sure you pay attention to
 1282 identifying information in the **display items**).

1283 *Title*

1284 A short informative title containing the major key words. The title should not contain
 1285 abbreviations or tradenames of drugs (see Wiley's [best practice SEO tips](#)). Include
 1286 geographical origin of study where this is critical for the study results.

1287 *Abstract*

1288 The abstract should be no more than 250 words and must be structured (for case
 1289 reports no more than 50 words and not structured) using the subheadings given
 1290 below. While this format is most appropriate for original articles, the authors of
 1291 reviews and brief communications are encouraged to also provide a structured
 1292 abstract:

- 1293 • Background – A brief explanation of why the study was performed.
- 1294 • Hypothesis/Objectives – A statement of the principal hypothesis tested in the
- 1295 study, a brief statement of the major objectives, or both.
- 1296 • Animals – A concise description of the number of animals used in the study
- 1297 including the population from which they were drawn (e.g. research colony,
- 1298 hospital population) and any special characteristics of the animals (e.g.
- 1299 disease status).
- 1300 • Materials and methods – A statement of overall study design (e.g.
- 1301 randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial; retrospective study) and
- 1302 principal interventions or methods.
- 1303 • Results - Concise statement of important results including numerical
- 1304 description of critical variables and statement of statistical significance.
- 1305 • Conclusions and clinical relevance – A summary of conclusions based on the
- 1306 study results and, where appropriate, a statement of the clinical importance of
- 1307 the study. The results should not be restated.

1308 *Key Words*

1309 Include up to six keywords that describe your paper for indexing purposes and list
 1310 them in alphabetical order. Keywords should be taken from those recommended by

the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at <https://www.nlm.nih.gov/mesh/>.

Main text

Original articles should normally be no more than 4000 words excluding abstract, figure and table legends, acknowledgement and references and subheadings can be incorporated if they contribute to clarity and structure. A referenced **Introduction** of typically up to 500 words provides the background to the work and finishes with the aim or the hypothesis of the study. The **Materials and methods** section (starting with a paragraph on **Ethics** if required for the study) needs to include data collection methods and detail on statistical analyses under a subheading "**Statistical methods**". These will also be scrutinized by referees, editors and, if necessary, a statistician. It is strongly recommended that authors seek advice from a professional statistician prior to submission if complex analyses are presented or to confirm that appropriate tests have been used to substantiate statements and conclusions. The **Results** should be presented concisely and not duplicate the methods. **Discussion**. The text will end with a sentence or two on the main **Conclusion** which should include a statement on the clinical relevance if appropriate. **Table** and **Figure legends** should be concise but comprehensive – tables and figures and their legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Tables and table/figure legends

The main text file should include all legends/captions for tables and figures. Smaller tables can be included in the main text file (after the captions/legends, before the references) but large tables and figures need to be uploaded as separate files ([see information on image requirements below](#)). All tables and figures should be **self-contained and complement, not duplicate**, information contained in the text and all need to be cited somewhere in the text.

Tables should be limited to those containing data important to understanding and interpreting results or help to reduce and clarify the text. Number tables consecutively in the order of the first citation in the text and supply a brief title for each. Give each column a short or abbreviated heading. Place explanatory material in footnotes, not in the heading. Explain in the footnotes all non-standard abbreviations that are used in each table. Identify statistical measures of variations such as standard deviation. If you use data from another published or unpublished source, obtain written permission and acknowledge fully.

Large tables should be submitted as separate table files (e.g. in Word or Excel), uploaded after the main text. If uploaded as separate files, table captions need to be

included in the main text file, after the main text, before the references. For both versions, tables should be editable, not pasted as images.

References

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In-text citations should be superscript numbers. Journal titles are abbreviated; abbreviations may be found in the following: [MEDLINE](#), [Index Medicus](#), or [CalTech Library](#).

Please see below for examples of reference content requirements.

For more information about this reference style, please see [this guide](#) published by Monash University.

Reference examples follow:

Journal article

For articles with 1 to 6 authors, list all authors. For articles with more than 6 authors, list the first 6 authors then add 'et al.'

1. Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2002 Jul 25;347:284–7.

1. O'Mahony S, Rose SL, Chilvers AJ, Ballinger JR, Solanki CK, Barber RW, et al. Finding an optimal method for imaging lymphatic vessels of the upper limb. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31:555–63. <https://doi.org/10.1007/s00259-003-1399-3>

Optional: If a journal carries continuous pagination throughout a volume (as many medical journals do), omit the month and issue number.

Book

2. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

Electronic Material

3. Holt M. The Health Care Blog [Internet]. San Francisco: Matthew Holt. 2003 Oct [cited 2009 Feb 13]. Available from: <http://thehealthcareblog.com/blog/category/matthew-holt/>

1386 Figures: Clinical photographs & photomicrographs

1387 All figures need to be uploaded as separate files (in a native image format, not
1388 embedded into a Word document) and all need to be referenced in the text. Limit
1389 figures to those that reduce or clarify the text. Images should be free of extraneous
1390 material and, where possible, if portions of the handler such as fingers or hands are
1391 to be included, particularly adjacent to lesions, they should be gloved.

1392 Images, grouped into one figure as a plate (montage, composite plate) are allowed
1393 and should have no tooling (space bars) to separate the individual images. The
1394 edges should be directly opposed. The files should be arranged to create a perfect
1395 square or rectangle. Plates should be either 90 or 180 mm wide (one or two column
1396 widths). Each part should be labelled in the top left-hand corner in black, (or if
1397 appropriate for clarity in white) in Arial, in lower case, with no brackets, starting with
1398 a, b, c, etc. The image editor reserves the right to regroup figures as required by
1399 typesetting. The editors strongly advise to limit the number of images in each figure
1400 to those that are absolutely needed to illustrate the content of the manuscript.

1401 **Image file format:** All images must be of high quality for reproduction. Poor-quality
1402 images may be removed from a manuscript and where critical to the content may
1403 lead to rejection of a manuscript. Images should have a minimal resolution of 300 dpi
1404 and at 90 or 180 mm wide (one or two column widths). Grey tone and line drawings
1405 require 600–1200 dpi. The images should be saved in TIFF (preferably) using IBM
1406 PC format or JPEG files (JPEG should be uncompressed). PowerPoint, PDFs and
1407 Word graphics are unsuitable.

1408 Graphics created in the CMYK colour palette (print colours) are preferable to those
1409 created in RGB (screen colours) to maximize the consistency of print reproduction.
1410 Images supplied in RGB will be converted to CMYK for printing; this may lead to
1411 some variations in colour representation. Immunofluorescence images may be
1412 submitted in RGB.

1413 When symbols, arrows, numbers or letters are used to identify parts of the
1414 illustrations, identify and explain each one clearly in the legend.

1415 **Figures submitted in colour** will be reproduced in colour, free of charge. Please
1416 note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are
1417 supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and
1418 white.

1419 *Photomicrographs*

1420 The microscope must be set up for Koehler illumination, so that the light is evenly
1421 dispersed in the image. The anatomic orientation of the skin should be
1422 maintained. The epidermis should be at the top of the image and horizontal; the
1423 background above the epidermis should be bright and white. The images should not
1424 contain artifacts from tissue processing/cutting/staining/coverslipping or photography.

1425 Authors are **not** obliged to use length or scale bars, reviewers/editors may
1426 recommend their use because it is deemed to be critical to the understanding of

photomicrograph; they are required for electron micrograph images. Magnification (scale) bars should be black, approximately 1 cm long and placed in the lower right corner, 5 mm above the lower margin and with the right end 5 mm from the right margin. The overall magnification should be specified according to the microscope objective (i.e 4X, 10X, 40X).

For more information about the preparation of images please see the guidelines as attached [here](#). While these guidelines were written some time ago and technology has moved on the general principles are still applicable. Please ensure that individual figures files are no larger than 5 MB. If your file is substantially bigger than this, please contact the Editorial Office: VDEedoffice@wiley.com; to discuss file saving and submission options.

For **graphs**, to ensure high-quality reproduction, symbols should be clear and even throughout and of sufficient size, that when reduced for publication, each item will still be legible. Graph axes should be labelled in sans serif (Helvetica or Arial) font. Letters, Numbers and Titles belong in the legends for illustrations, not on the illustrations themselves. Software programmes such as GraphPad can be used to download graphs into a word document for submission as an image/figure file.

Graphical abstract (optional)

This journal requires a graphical abstract: a single, concise figure that serves as a visual summary of the main research findings described in your manuscript.

Graphical abstracts should be provided in the highest resolution possible following Wiley's general guidelines for [figure preparation](#).

In addition to our general guidelines, the graphical abstract must meet the following requirements:

- **Color:** use palettes and color combinations that are accessible to readers who are colorblind.
- **Permissions:** you are responsible for obtaining permission to use any images from outside sources.
- **Recommendations:** use a simple graphic that is easy to follow by reading it either left to right or from top to bottom. Do not use data-heavy tables and avoid jargon or abbreviations that make it difficult for a reader to understand the main message of your abstract.

Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article, even so, it provides greater depth and background. It is hosted online and appears with limited editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc. [Click here](#) for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

1467 General Style Points & Examples

1468 *Veterinary Dermatology* is an international journal and contributions should therefore
 1469 be written clearly and simply so that they are accessible to readers for whom English
 1470 is not their first language. Thus, abbreviations, particularly those that are not
 1471 standard, should be kept to a minimum. The background, rationale and main
 1472 conclusions of the study should be clearly explained. Titles and abstracts, in
 1473 particular, should be written in language that will be readily intelligible to any scientist.
 1474 Essential but specialized terms should be explained concisely at first use. Papers will
 1475 be rejected for poor language. Non-native English speakers may occasionally
 1476 receive feedback from editors and reviewers regarding language and grammar usage
 1477 in their manuscripts.

- 1478 • **Abbreviations:** use only if the term is used repeatedly. Write word in full at
 1479 first use with abbreviation in parentheses, thereafter use the abbreviation only.
- 1480 • **Units of measurement:** SI or SI-derived units
 1481 (<https://www.bipm.org/en/about-us/> for more information).
- 1482 • **Numbers:** Use numerals to express numbers that represent time, dates, ages,
 1483 scores and points on a scale; numbers 10 and above (e.g., 12-cm wide), and
 1484 for numbers that immediately precede a unit of measurement (e.g., a 5-mg
 1485 dose).
- 1486 • **Statistics:** use an **italicised lower-case *p*** for levels of statistical significance.
- 1487 • **Drug dosages** are given as: e.g. mg/kg; µg/kg; also use 'once daily', 'twice
 1488 daily' etc.
- 1489 • For **animal breed names**, please check recent articles for information about
 1490 the spelling of animal breeds.
- 1491 • **Chemical substances and drugs** should be referred to by the generic name
 1492 only. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their
 1493 generic name at first use, mentioning the proprietary name and the name of
 1494 the manufacturer in parentheses e.g. **fenbendazole (Panacur; Intervet-
 1495 Schering Plough)**. Spellings of drugs should follow the recommended
 1496 International Non-Proprietary Names (rINN). Common examples
 1497 include **cefalexin, ciclosporin, meticillin** and **rifampicin**.
- 1498 • Detail on products such as equipment, software or methods should be given
 1499 as: Product name (Company name); e.g. Datex CD 200-02 (Datex); or
 1500 SuperScript®III First-Strand Synthesis kit (Invitrogen). For case reports and
 1501 brief communications, these can be given as foot notes.
- 1502 • **Names of microbes, genes, proteins:** Upon its first use in the title, abstract,
 1503 and text, the common name of a species should be followed by the scientific
 1504 name (genus, species) in parentheses. For well-known species, however, full
 1505 scientific names may be omitted from article titles (e.g. MRSA). If no common
 1506 name exists in English, only the scientific name should be used.
- 1507 • For **gene, protein and other specialized names** authors can use their
 1508 preferred terminology so long as it is in current use by the community, but
 1509 they **must give all known names** conforming to internationally agreed
 1510 nomenclature at first use in the paper.

1511 Article Preparation Support

1512 [Wiley Editing Services](#) offers expert help with English Language Editing, as well as
1513 translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical
1514 abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

1515 Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about
1516 writing and preparing your manuscript.

1517

1518 8. EDITORIAL POLICIES

1519 Peer review process: Double-blinded peer review by at least two referees. Average
1520 time to first editorial decision 33 days.

1521 All manuscripts are assessed by the editorial office initially for plagiarism,
1522 completeness of statements and screened for appropriate formatting and style. They
1523 may be returned to authors at that stage for adjustments before forwarded to an
1524 editor. If a manuscript is flagged by the editor as problematic, it would get reviewed
1525 by at least two additional members of the editorial team and then either sent for peer
1526 review or occasionally be rejected without peer review if major concerns are found
1527 (e.g. not within the scope of the journal, major ethical or design flaws). They will
1528 collaborate, if required, with institutions and other organizations that investigate
1529 cases of suspected research misconduct following [COPE guidance](#).

1530 *Editorial Review and Acceptance*

1531 The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research
1532 and its significance to journal readership. Except where otherwise stated,
1533 manuscripts are double-blind peer reviewed. Papers will only be sent to review if the
1534 Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and
1535 relevance requirements.

1536 Wiley's policy on confidentiality of the review process is [available here](#).

1537 **Refer and Transfer Program**

1538 Wiley believes that no valuable research should go unshared. This journal
1539 participates in Wiley's [Refer & Transfer program](#). If your manuscript is not
1540 accepted, you may receive a recommendation to transfer your manuscript to another
1541 suitable Wiley journal, either through a referral from the journal's editor or through our
1542 Transfer Desk Assistant.

1543 *Data Sharing and Data Availability*

1544 *Veterinary Dermatology* expects data sharing. Review [Wiley's Data Sharing](#)
1545 [policy](#) where you will be able to see and select the data availability statement that is
1546 right for your submission.

1547 **Data Citation**

1548 Please review [Wiley's Data Citation policy](#).

1549 *Research Reporting Guidelines*

1550 Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate
1551 it, and use it. Authors are encouraged to adhere to the following research reporting
1552 standards.

- 1553 • [ARRIVE guidelines](#)
- 1554 • [REFLECT statement](#)

1555 *Sequence Data*

1556 **Nucleotide sequence data** can be submitted in electronic form to any of the three
1557 major collaborative databases: DDBJ, EMBL, or GenBank. It is only necessary to
1558 submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL, and GenBank
1559 on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number
1560 information is: 'These sequence data have been submitted to the
1561 DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345'. Addresses are
1562 as follows:

- 1563 • DNA Data Bank of Japan (DDBJ) ddbj.nig.ac.jp
- 1564 • EMBL Nucleotide Archive: ac.uk/ena
- 1565 • GenBank ncbi.nlm.nih.gov/genbank

1566 **Proteins sequence data** should be submitted to either of the following repositories.

- 1567 • Protein Information Resource (PIR): georgetown.edu
- 1568 • SWISS-PROT: ch/sprot/sprot-top

1569 *Conflict of Interest*

1570 The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of
1571 interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as
1572 influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of
1573 interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the
1574 work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of
1575 interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a
1576 company board of directors, membership of an advisory board or committee for a
1577 company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. Even if it
1578 was not restricted to the project described in the submission.

1579 The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors
1580 have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the
1581 responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and
1582 collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other
1583 relationships.

1584

1585 *Publication Ethics*1586 This journal is a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#).

1587 Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of
 1588 overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read the Top 10 Publishing
 1589 Ethics Tips for Authors [here](#). Wiley's Publication Ethics Guidelines can be found
 1590 at authorservices.wiley.com/ethics-guidelines/index.html.

1591

1592 *ORCID*

1593 As part of the journal's commitment to supporting authors at every step of the
 1594 publishing process, the journal requires the submitting author (only) to provide an
 1595 ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to
 1596 complete. [Find more information here.](#)

1597

1598

9. AUTHOR LICENSING

1599 If a paper is accepted for publication, the author identified as the formal
 1600 corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author
 1601 Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required
 1602 to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

1603 Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright
 1604 agreement, or [Open Access](#) under the terms of a Creative Commons License.

1605 General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review
 1606 the Creative Commons License options offered under Open Access, please [click](#)
 1607 [here](#). (Note that certain funders mandate a particular type of CC license be used; to
 1608 check this please click [here](#).)

1609 **Self-Archiving Definitions and Policies:** Note that the journal's standard copyright
 1610 agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific
 1611 conditions. Please click [here](#) for more detailed information about self-archiving
 1612 definitions and policies.

1613 **Open Access fees:** Authors who choose to publish using Open Access will be
 1614 charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is
 1615 available [here](#).

1616 **Funder Open Access:** Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance
 1617 with specific Funder Open Access Policies.

1618

10. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted Article Received in Production

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with [Wiley Author Services](#). The author will be asked to sign a publication license at this point.

Proofs

Authors will receive an e-mail notification with a link and instructions for accessing HTML page proofs online. Page proofs should be carefully proofread for any copyediting or typesetting errors. Online guidelines are provided within the system. No special software is required, all common browsers are supported. Authors should also make sure that any renumbered tables, figures, or references match text citations and that figure legends correspond with text citations and actual figures.

Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process – authors should check proofs carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt of first proof.

Correction to Authorship

In accordance with [Wiley's Best Practice Guidelines on Research Integrity and Publishing Ethics](#) and the [Committee on Publication Ethics' guidance](#), *Veterinary Dermatology* will allow authors to correct authorship on a submitted, accepted, or published article if a valid reason exists to do so. All authors – including those to be added or removed – must agree to any proposed change. To request a change to the author list, please complete the [Request for Changes to a Journal Article Author List Form](#) and contact either the journal's editorial or production office, depending on the status of the article. Authorship changes will not be considered without a fully completed Author Change form. [Correcting the authorship is different from changing an author's name; the relevant policy for that can be found in [Wiley's Best Practice Guidelines](#) under "Author name changes after publication."]

Early View

The journal offers rapid publication via Wiley's Early View service. [Early View](#) (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as Editors also need to review proofs. Once the article is published on Early View, no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

11. POST PUBLICATION

Article Promotion Support

Wiley Editing Services offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

Access and Sharing

When the article is published online:

- The author receives an email alert (if requested).
- The link to the published article can be shared through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).
- The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

Print copies of the article can now be ordered (instructions are sent at proofing stage or use the below contact details).

To find out how to best promote an article, click [here](#).

Measuring the Impact of an Article

Wiley also helps authors measure the impact of their research through specialist partnerships with **Kudos** and **Altmetric**.

12. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS

Sunmathi Devadas
VDEedoffice@wiley.com