

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**SPRAY DE QUITOSANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
CUTÂNEAS EM RATAS DIABÉTICAS**

Thamiza Carla Costa dos Santos
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Neusa Margarida Paulo

Goiânia
2016



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1 1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

1 2. Identificação da Tese ou Dissertação

2

Nome completo do autor: THAMIZA CARLA COSTA DOS SANTOS

Título do trabalho: SPRAY DE QUITOSANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATAS DIABÉTICAS

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 02 / 10_ / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

THAMIZA CARLA COSTA DOS SANTOS

**SPRAY DE QUITOSANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
CUTÂNEAS EM RATAS DIABÉTICAS**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de mestre em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia

Linha de Pesquisa:

Técnicas cirúrgicas e anestésicas, patologia clínica cirúrgica e cirurgia experimental

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Neusa Margarida Paulo - EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Prof^a. Dr^a. Kênnia Rocha Rezende – FF/UFG

Prof^a. Dr^a. Liliana Borges de Menezes – IPSTP/UFG

Goiânia
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Santos, Thamiza Carla Costa dos

Spray de quitosana na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos [manuscrito] / Thamiza Carla Costa dos Santos. - 2016. xii, 49 f.

Orientador: Profa. Dra. Dra. Neusa Margarida Paulo; co orientadora Dra. Dra. Kênnia Rocha Rezende; co-orientador Dr. Dra. Lílíana Borges de Menezes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2016.

Anexos.

Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Curativo. 2. Diabetes. 3. Hidrogel. 4. Polissacarídeo. 5. Quitina. I. Paulo, Dra. Neusa Margarida, orient. II. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO **450** DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE
2 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
3 DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às **09h00min** do dia **02/08/2016**, reuniu-se na sala
4 de defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, a Comissão Julgadora infra
5 nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado (a) pelo
6 (a) Pós-Graduando (a) **Thamiza Carla Costa dos Santos**, intitulada: *“Spray de quitosana na*
7 *cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas”*, apresentado para obtenção do Título de
8 Mestre em Ciência Animal, junto à Área de Concentração: **Patologia, Clínica e Cirurgia Animal**,
9 desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora, **Profa. Dra. Neusa Margarida Paulo**,
10 iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Thamiza Carla Costa dos Santos**
11 para exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a
12 palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato
13 (a), durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para
14 responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos
15 regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a)
16 candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

17 Profa. Dra. Neusa Margarida Paulo (Orientador (a))

aprovada

18 Prof. Dr. Luciano Schneider da Silva

Aprovado

19 Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno

aprovado

20 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Thamiza Carla**
21 **Costa dos Santos**, habilitado [(**Habilitado(a) ou não Habilitado(a)**)]
22 pelo(s) motivo(s) abaixo exposto(s):

23 _____

24 _____

25 _____

26 _____

27 _____

28 _____

29 _____

30 _____

31 _____

32 _____

33 _____

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



34 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

35 Spray e gel de gentosona na
36 cicatrização de feridas crônicas em
37 rotas diabéticas

38

39

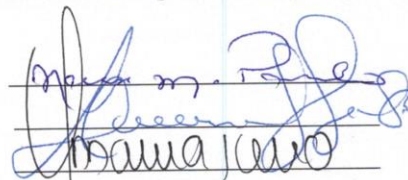
40

41 Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Neusa Margarida Paulo** lavrei a presente ata que, após
42 lida e achada conforme foi por todos assinada.

43 Prof. Dra. Neusa Margarida Paulo

44 Prof. Dr. Luciano Schneider da Silva

45 Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno



Dedico este trabalho aos meus pais,
demais familiares e namorado por todos
os incentivos e ajudas concedidos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus por ter guiado meus caminhos e sonhos, de forma tão maravilhosa, por ter me dado o prazer de conhecer e conviver com pessoas do bem, que, mesmo na distância, sempre se alegraram com minhas vitórias e se entristeceram com minhas derrotas. Deus foi e sempre será a luz na minha vida!

À minha família, pelo amor e apoio concedidos em todos esses anos de convívio, em especial aos meus pais, Francisco Sales dos Santos Filho e Joana Maria Costa dos Santos, que me ensinaram a buscar nos estudos o atalho para minhas realizações. Ao meu irmão Lucas Costa, pelo carinho comigo e pelos cuidados com os nossos pais nesses anos em que estive ausente. Aos meus tios Jacilene Mendes, Dirce-Mary Estrela e Samuel Costa, pelos incentivos. E aos meus avós, que, mesmo nas dificuldades, repassaram aos filhos e netos mensagens positivas da vida e de Deus.

Ao meu namorado Léo Sousa Galvão, pelos conselhos e, principalmente, por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava.

À família Sousa Galvão, sobretudo à Lady-anne Galvão e Lourdes Maria Galvão, pela amizade tão sincera.

À minha doce e amável orientadora Neusa Margarida Paulo, pessoa que, desde já, sinto saudades e sempre lembrarei pela alegria. Agradeço pela amizade e ensinamentos. Graças à senhora e aos demais professores, saio da UFG sendo outra profissional.

Às minhas coorientadoras Kênnia Rocha Rezende e Liliana Borges de Menezes, pela paciência e disponibilidade em esclarecer minhas dúvidas e angústias inerentes à pesquisa e às importantes contribuições na elaboração deste estudo.

Aos professores Adilson Donizeti, Aline Vasconcelos, Ana Paula Santin, Emmanuel Arnhold, Leandro Guimarães, Maria Clorinda, Naida Cristina e Rosângela de Oliveira, pelos valiosos conhecimentos repassados.

Aos professores Danieli Brolo, Luiz Franco, Olízio Claudino e Percílio Brasil, pelo carinho, auxílio, amizade e conselhos. Foi maravilhoso conhecê-los! Já me pego sentindo saudades de todos.

À adorável professora Marina Pacheco, pela ajuda na confecção das lâminas e pela enorme vontade em me ajudar a compreender os resultados obtidos.

A todos os funcionários da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás pelo respeito e carinho que tiveram comigo e com o Léo nesses anos de UFG.

Aos amigos de pós-graduação, Antônio Dionísio Noronha, Elizama Alves, Ernani Barbosa, Jayanna da Silva, Jakeline Ferreira, Karen Bastos, Karla Braga, Laís Castro, Lidiana Piveta e Luma Castro, pelos momentos de alegria e aprendizado que tive ao lado de vocês. Sem dúvida, o acolhimento de todos me deu força para superar todos os desafios enfrentados durante o mestrado.

Aos grandes amigos Danilo Rodrigues, Fernanda Figueiredo e Letícia Melo, por tudo! Tenho certeza que Deus os colocou no meu caminho não só para me auxiliar, mas, principalmente, para tornar a saudade de casa menos dolorida. Vocês, juntamente com o Léo, se tornaram a minha segunda família. Jamais me esquecerei da dedicação e empenho que tiveram na realização desta pesquisa. Torço para que a distância entre Goiânia, Castanhal e São Luís não seja um empecilho para nos afastarmos.

À Tais Andrade Dias e Cibele Cunha, pela valiosa contribuição na realização deste estudo. Vocês foram muito importantes para que o experimento ocorresse o mais próximo possível do esperado.

À Universidade Federal de Goiás, pelas instalações e profissionais utilizados, e à Capes, pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a todo o povo goiano, pelos dois anos de crescimento pessoal, profissional e cultural que obtive no seu estado.

“A alegria encontra-se na luta, nas tentativas, em todos os sofrimentos, não propriamente na vitória.”

Mahatma Ganghi

“Vencer é um júbilo, mas os desafios que enfrentamos e superamos ao longo do caminho possibilitam uma satisfação ainda maior.”

Daisaku Ikeda

“Não tenho tudo que amo, mas amo tudo o que tenho.”

Ana Severiano

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Pele	4
2.2. Ferida.....	6
2.3. Cicatrização	6
2.3.1. Tipos de cicatrização	9
2.4. Diabetes Mellitus.....	10
2.4.1. Histórico	10
2.4.2. Anatomia e fisiologia pancreática	11
2.4.3. Definição e classificação	12
a) Diabetes mellitus tipo I.....	12
b) Diabetes mellitus tipo II.....	13
2.4.4. Cicatrização em pacientes diabéticos	15
2.5. Quitosana.....	17
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 2 - <i>Spray</i> de quitosana na cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas ..	24
Introdução.....	2
Material e Métodos.....	3
Resultados.....	5
Discussão.....	9
Conclusão	12
Referências	12
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
ANEXO A – Normas da Revista Ciência Animal Brasileira	42

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

- FIGURA 1 - Gráfico representativo da evolução da redução de feridas cutâneas em ratas Wistar diabéticas tratadas com solução salina 0,9% (GC), gel de quitosana a 2% (GG) e spray de quitosana (GS). 5
- FIGURA 2 - Evolução macroscópica da contração de feridas em ratas diabéticas ao segundo, sexto e 14º dia pós-cirúrgico no GC (controle), GG (gel de quitosana a 2%) e GS (spray de quitosana). 6
- FIGURA 3 - Fotomicrografias da epiderme de feridas cutâneas de ratas diabéticas (HE, 20X). Reepitelização ausente (seta preta) ao terceiro dia pós-operatório nos animais GC (grupo controle), GG (gel de quitosana a 2%) e GS (spray de quitosana). Reepitelização parcial (seta preta) nos animais GC, GG e GS no sétimo dia pós-operatório. Reepitelização total (seta preta) ao 14º dia pós-operatório nos animais GC, GG e GS.. 7

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Porcentagem de contração média das feridas cutâneas em ratas Wistar diabéticas tratadas com solução salina 0,9% (GC), gel de quitosana a 2% (GG), e spray de quitosana (GS) ao 14 dia pós-operatório..... 6
- TABELA 2 - Parâmetros microscópicas avaliados na derme superficial e profunda de ratas Wistar diabéticas tratados com solução salina 0,9% (GC), gel de quitosana a 2% (GG) e spray de quitosana (GS) no terceiro dia pós-operatório 8
- TABELA 3 - Parâmetros microscópicas avaliados na derme superficial e profunda de ratas Wistar diabéticas tratados com solução salina 0,9% (GC), gel de quitosana a 2% (GG) e spray de quitosana (GS) no sétimo dia pós-operatório 9
- TABELA 4 - Parâmetros microscópicas avaliados na derme superficial e profunda de ratas Wistar diabéticas tratados com solução salina 0,9% (GC), gel de quitosana a 2% (GG) e spray de quitosana (GS) no 14º dia pós-operatório 9

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs	Produtos de glicação avançada
DM	Diabetes Mellitus
EGF	Fator de crescimento epidermal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
IAPP	Hormônio polipeptídico amiloide das ilhotas
IGF-1	Fator de crescimento 1 tipo insulina
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
MEC	Matriz extracelular
MC4R	Receptor 4 da melanocortina
MMP-1	Metaloproteinase de matriz 1
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2
MMP-8	Metaloproteinase de matriz 8
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
PAF	Fator de ativação plaquetário
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PTP1B	Proteína tirosina fosfatase 1B
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TIMP-1	Inibidores de metaloproteinase de matriz 1
TIMP-2	Inibidores de metaloproteinase de matriz 2
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

A cicatrização é um evento complexo e dinâmico que visa a restauração da integridade tecidual. No entanto, alguns fatores, como o diabetes, podem prejudicar este evento fisiológico. A quitosana, um derivado da quitina, tem sido cogitada como uma opção versátil e eficaz para o tratamento de feridas. O presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar o efeito do gel de quitosana a 2% e spray à base de quitosana na cicatrização por segunda intenção de feridas cutâneas em ratas diabéticas. Foram utilizadas 54 ratas, divididas, aleatoriamente, em três grupos: grupo controle (GC) grupo gel de quitosana a 2% (GG) e grupo spray de quitosana (GS) com 18 animais, cada. As ratas dos grupos GC, GG e GS tiveram suas feridas tratadas diariamente com solução fisiológica 0,9%, gel de quitosana a 2% e *spray* à base de quitosana, respectivamente. Os grupos foram subdivididos em três subgrupos (n=6) conforme os tempos de análise histológica da ferida (terceiro, sétimo e 14º dia). A indução do diabetes mellitus, nas ratas, ocorreu por meio da aplicação intraperitoneal da aloxana (120mg/kg). Após a confirmação do estado de diabetes, os animais foram anestesiados e as feridas confeccionadas com auxílio de um punch de 9,0mm na região dorsal. Foram realizadas análises macroscópicas e microscópicas. As análises macroscópicas mostraram que ao 14º dia, o gel de quitosana 2% e o spray de quitosana proporcionaram uma taxa de contração de 100% e 99%, respectivamente. A nível histológico, observou-se o recrutamento antecipado de células mononucleares, fibroblasia e deposição de tecido fibrovascular denso acentuados e fibrose nas feridas dos GG e GS, enfatizando a capacidade deste biopolímero em otimizar a cicatrização de diabéticos. Podendo, portanto, ser uma opção terapêutica como também a base para o desenvolvimento de outras formulações que proporcionem a reparação de feridas em pacientes diabéticos.

Palavras-Chaves: Curativo, Diabetes, Hidrogel, Polissacarídeo, Quitina

ABSTRACT

The healing is a complex and dynamic event aimed at the restoration of tissue integrity. However, some factors, such as diabetes, can harm this physiological event. Chitosan, a derivative of chitin, has been considered as a versatile and effective option for the treatment of wounds. This study aimed to evaluate and compare the effect of chitosan 2% gel and chitosan spray based on secondary intention healing of skin wounds in diabetic rats. 54 rats were used, divided randomly into three groups: control group (CG), chitosan 2% gel group (GG), and Chitosan spray group (GS) with 18 animals each. The rats in GC, GG, and GS had their wounds treated daily with saline solution 0.9%, chitosan 2% gel, and chitosan spray, respectively. The groups were divided into three subgroups (n = 6) according to the times of histological analysis of wound (third, seventh, and 14th day). The induction of diabetes in the rats took place by intraperitoneal application of alloxan (120 mg/kg). After confirming the state of diabetes, the animals were anesthetized and the wounds made with the aid of a punch 9.0mm in the dorsal region. Macroscopic and microscopic analyzes were performed. Macroscopic analysis showed that after 14 days, the chitosan 2% gel and chitosan spray gave a contraction rate of 100% and 99%, respectively. At the histological level, there was the anticipated recruitment of mononuclear cells, fibroblasia, and deposition of dense fibrovascular tissue and marked fibrosis in the wounds of GG and GS, emphasizing the ability of this biopolymer to optimize the healing of diabetics. It can therefore be a therapeutic option for the development of other formulations that provide wound repair in diabetic patients.

Keywords: Curative, Diabetes, Hydrogel, Polysaccharide, Chitin

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão dos vertebrados e é indispensável para a sobrevivência, uma vez que é responsável pela termorregulação, proteção contra agentes externos, percepção de estímulos ambientais, controle sob a perda de água, produção de vitamina D e armazenamento de gordura, eletrólitos e carboidratos^{1,2}. Por atuar como barreira protetora, encontra-se exposta aos danos de natureza química, física ou biológica, que podem ocasionar a ruptura da sua integridade e desencadear uma combinação de eventos denominada cicatrização³.

O processo cicatricial é um fenômeno complexo no qual participam citocinas, fatores de crescimento, matriz extracelular (MEC), mediadores e vários tipos celulares^{2,4}. No entanto, apesar de ser um acontecimento fisiológico que visa à restauração tecidual em tempo hábil, fatores locais, extrínsecos e intrínsecos, como sujidades, infecção, radioterapia, corticoterapia, desnutrição e diabetes mellitus, podem dificultar o reestabelecimento da normalidade, constituindo um desafio médico a ser superado^{3,5}.

No que diz respeito ao diabetes mellitus (DM), uma das principais endocrinopatias relatadas na medicina e medicina veterinária, observa-se um aumento expressivo no número de portadores. Na medicina, esta doença é considerada um problema de saúde pública, visto que é alarmante o crescimento mundial no número de diabéticos, desencadeado, principalmente, pelo sedentarismo e obesidade. Estima-se que, com um aumento anual médio de 2,7%, até 2030 existam mais de 500 milhões de pessoas com DM^{6,8}. Aspectos como urbanização, desenvolvimento econômico e envelhecimento estão cada vez mais relacionados ao DM, principalmente em países de baixa e média renda, onde os recursos destinados à saúde são mais escassos⁶. Em cães e gatos, a taxa de prevalência hospitalar é de 0,4-1,2%^{6,7}.

Conceitualmente, a DM é definida como um distúrbio metabólico, crônico, singularizado pela presença da hiperglicemia persistente⁹⁻¹¹. As consequências desse desequilíbrio glicêmico são evidenciadas por meio de lesões, disfunções e falências em diversos órgãos, como olhos, vasos sanguíneos e cérebro, e são desencadeadas pela macro e microangiopatia e/ou neuropatia^{9,10}.

Uma das principais alterações relacionadas ao DM é a ocorrência expressiva de feridas complexas e crônicas, como úlceras de extremidades inferiores e feridas associadas

com a doença vascular periférica^{9,12}. O DM representa um dos principais elementos responsáveis pelo atraso em todos os estágios da cicatrização, uma vez que está envolvido na redução da angiogênese e da formação e migração de fibroblastos e queratinócitos, aumento e formação contínua de citocinas e metaloproteinases, além da diminuição na força de tensão da ferida, que resulta no aumento da taxa de deiscências^{3,13,14}. A deficiência na macro e microcirculação local intensifica o retardado cicatricial por meio do decréscimo da oxigenação e nutrição nos tecidos feridos¹⁵.

Apesar dos recentes avanços das terapias complementares, tais como a otimização da nutrição, tratamentos à base de fatores de crescimento, curativos para feridas crônicas e substitutos sintéticos de pele, as condições de cicatrização anormal permanecem como um problema clínico significativo causador de morbidade e mortalidade^{16,17}. Diante disso, é indispensável o desenvolvimento de novas opções terapêuticas, posto que os curativos atualmente disponíveis, como géis, ataduras, cremes e gazes são, na maioria das vezes, bastante onerosos^{9,18,19}.

Os curativos empregados rotineiramente na prática clínica são o biológico, sintético e biológico-sintético. Nenhum está destituído de desvantagens, pois para ser classificado como ideal, é necessário ser constituído de um biomaterial atóxico, não alergênico, não aderente, facilmente disponível e que otimize a cicatrização por meio da criação de um ambiente úmido, no qual haja a possibilidade da ocorrência de trocas gasosas e da remoção de exsudatos da lesão. Também é indispensável a ação deste agente como uma barreira de proteção contra os microrganismos²⁰.

Na busca por uma cicatriz com melhor aspecto e funcionalidade, a conduta médica moderna encontra na quitina e em seus derivados uma opção válida, versátil e eficaz de tratamento²⁰. A quitina é um polissacarídeo de ocorrência natural, presente estruturalmente no exoesqueleto de artrópodes e na parede celular de fungos e leveduras. Sua insolubilidade é um importante obstáculo no seu processamento, uso e caracterização. Portanto, a quitina apresenta maior aplicabilidade quando convertida à quitosana, por meio do processo de desacetilação parcial²¹.

Devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxicidade, a quitosana é considerada um novo tipo de material funcional com aplicações nas áreas biotecnológica, farmacêutica, ciência de materiais e terapia gênica²². Na medicina e medicina veterinária, a quitosana encontra ampla empregabilidade por conta das suas propriedades antioxidante, antimicrobiana, angiogênica, hemostática e adjuvante na cicatrização²³⁻²⁵.

Diante dessas relevantes especificidades e dos possíveis materiais obtidos, reconhece-se a quitosana como biomaterial bastante promissor, principalmente no que tange aos produtos relacionados com a cicatrização²⁶. Com base nisto, objetivou-se com este trabalho avaliar e comparar o spray de quitosana e o gel de quitosana a 2% na cicatrização de feridas cutâneas de ratas diabéticas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Pele

A pele, o maior órgão dos vertebrados, recobre toda a superfície corporal e representa cerca de 16% do peso corporal do homem, 24% do cão filhote e 12% do cão adulto. É responsável pela termorregulação, proteção contra agentes externos, percepção de estímulos ambientais, controle da perda de água, produção de vitamina D e armazenamento de gordura, eletrólitos, carboidratos e proteínas^{1,2}.

Nos cães e gatos, existem quatro padrões anatômicos tegumentares, que se diferem, principalmente em relação à espessura: pele com pelos, pele escrotal, coxins e plano nasal. A pele com pelos apresenta uma espessura variável (0,5 a 5,0mm no cão e 0,4 a 2,0mm no gato) que diminui nos sentidos dorso ventral do tronco e proximal distal dos membros. As regiões auricular, axilar, inguinal e perianal detêm a pele mais fina, enquanto que o dorso, pescoço, cabeça, região glútea e base da cauda apresentam um tecido tegumentar mais espesso. No entanto, a pele de espessura mais delgada e acentuada se encontra no escroto e, coxins e plano nasal, respectivamente. Fatores como raça e idade podem influenciar na densidade da pele²⁷.

Histologicamente, a pele é constituída por uma camada de origem ectodérmica, a epiderme, e por outra de origem mesodérmica, a derme, que se encontram separadas pela membrana basal. Abaixo da derme, localiza-se a hipoderme, uma camada de tecido conjuntivo frouxo que não é considerado componente da pele, mas que une esta aos demais órgãos, e que funciona como reservatório de energia e isolante térmico¹.

A epiderme é a camada mais externa e delgada da pele. É formada pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Apresenta-se constituída pelos queratinócitos, melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans, e subdividida nos estratos basal (estrato germinativo), espinhoso, granuloso, lúcido e córneo (estrato disjunto)¹.

A arquitetura da epiderme é semelhante em todos os mamíferos, contudo, há diferenças entre as espécies, entre os indivíduos da mesma espécie e entre as diferentes regiões corporais. Sua espessura, o tipo de estrato córneo e a presença ou ausência do estrato lúcido são diretamente influenciados pela densidade da pelagem, a ponto de se observar uma redução na espessidão desta camada à medida que a quantidade de pelo aumenta. Em média, a espessura epidérmica canina e felina varia entre 15 e 40µm. O gato, quando comparado ao

cão, apresenta a epiderme mais fina e o ser humano, em relação aos demais mamíferos peludos, possui a camada mais grossa²⁷.

O estrato basal é formado por uma fileira de células-tronco cúbicas ou cilíndricas, basófilas, que repousam sobre a membrana basal. Caracteriza-se pela intensa proliferação celular e, juntamente com o estrato espinhoso, é responsável pela constante renovação da epiderme. O índice mitótico é maior nas áreas com pouca pelagem ou glabras, que estão sujeitas aos danos constantes. Neste estrato, os tipos celulares presentes são os melanócitos, células de Merkel e queratinócitos. Estas últimas células se multiplicam e migram constantemente, a fim de formar os demais níveis epidérmicos^{1,27}.

O estrato espinhoso, localizado acima do estrato basal, é composto por um número variável de células cúbicas ou levemente achatadas, com prolongamentos citoplasmáticos que se ligam aos das células vizinhas por meio dos desmossomos. Esses prolongamentos formados por queratina, associados aos desmossomos, são responsáveis pela coesão entre as células e resistência ao atrito¹. Apesar de apresentarem células-tronco de queratinócitos, o índice mitótico é mais reduzido quando comparadas ao do estrato basal. É possível observar, por meio da microscopia, as células de Langerhans que atuam como apresentadoras de antígenos na pele e que, associadas aos linfócitos T epidérmicos, formam um tecido linfoide²⁷.

Situado acima do estrato espinhoso, o estrato granuloso é constituído por uma ou mais camadas de células romboides ou pavimentosas, que possuem grânulos de cerato-hialina e grânulos lamelares²⁷. Por meio do conteúdo lipídico extravasado dos grânulos lamelares no espaço intercelular, é formada uma barreira na pele contra substâncias estranhas e desidratação¹. Este estrato está ausente ou delgado nas regiões mandibular e temporal, dorso da cabeça, ouvido externo e plano nasal, e se apresenta bem denso nos coxins²⁷.

Presente apenas em áreas mais espessas da pele, como coxins e plano nasal, o estrato lúcido é formado por várias camadas de células pavimentosas, translúcidas e anucleadas²⁷.

O estrato córneo é a última e mais superficial camada da epiderme. É composta por várias camadas de corneócitos, que são células compactadas, queratinizadas e anucleadas e que sofrem descamação gradual. No cão, a espessura desta camada varia entre cinco a 1500µm e no gato de três a 35µm^{1,27}.

A derme é assinalada como uma camada composta por tecido conjuntivo, localizada entre a epiderme e a hipoderme, e integrada por feixes de músculo esquelético na derme da face e do escroto; músculo liso (músculo eretor do pelo); apêndices dérmicos, como

folículos pilosos e glândulas anexas; vasos sanguíneos e linfáticos; nervos e elementos celulares, como fibroblastos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, plasmócitos, adipócitos^{1,27}.

2.2. Ferida

A pele, quando submetida aos danos de natureza química, física ou biológica desenvolve uma solução de continuidade denominada ferida, que é classificada, após exame físico e histórico clínico, em ferida aguda ou crônica conforme a sua duração e em limpa, limpa-contaminada, contaminada e infeccionada, de acordo com o grau de contaminação³.

As injúrias agudas são resultantes de cirurgias ou traumas e, geralmente, cicatrizam em tempo hábil e sem complicações^{28,29}. As lesões classificadas como crônicas são caracterizadas por atraso no processo de reparação superior a seis semanas e apresentam elevado nível de exsudato devido à inflamação prolongada, destruição dos tecidos adjacentes e maior propensão às infecções²⁸⁻³¹.

As feridas limpas são as que não apresentam sinais de infecção, geradas em condições assépticas e que não envolvem os sistemas respiratório, digestivo, genito-urinário. Nestas lesões, a probabilidade de infecção é baixa, em torno de 1 a 5 %. As lesões limpa-contaminadas são as que apresentam certo grau de contaminação e que compreendem, normalmente, intervenções cirúrgicas dos sistemas respiratório, digestivo e genito-urinário. O risco de infecção é cerca de 10%. As lesões com mais de seis horas de injúria, acidentais, confeccionadas perto ou sobre áreas inflamadas e contaminadas, ou em que a técnica asséptica não foi devidamente respeitada, são consideradas contaminadas. Nestas, os níveis de infecção podem atingir entre 20 e 30%. As lesões que apresentam sinais compatíveis de infecção, como a presença de pus, perfuração de vísceras ou contagem bacteriana superior a 100.000 organismos por grama de tecido, são classificadas como infeccionadas^{2,3}.

2.3. Cicatrização

O processo cicatricial é um evento fisiológico complexo, caracterizado por três fases distintas, sobrepostas e assim denominadas: inflamação, proliferação e maturação/remodelação. Nestas etapas, observa-se a adequada interação entre citocinas, fatores de crescimento, mediadores, MEC e vários tipos celulares^{2,4}.

A fase inflamatória inicia imediatamente após a lesão e se prolonga, geralmente, por 24 a 72 horas. É considerada uma importante resposta do organismo à injúria, e visa à

reparação tecidual e a restauração da funcionalidade. Esta etapa é constituída por respostas vasculares, como a hemostasia, e celulares, formadas pelos leucócitos^{4,32}.

Como resultado do trauma, ocorre a ruptura dos vasos sanguíneos, com conseqüente extravasamento de sangue no leito da ferida. Simultaneamente, por meio das descargas adrenérgicas e mediadores originados da degranulação de mastócitos, ocorre a vasoconstrição reflexa, com duração de cinco a 10 minutos para a formação do coágulo plaquetário^{2,32}. As plaquetas presentes na lesão são aderidas, por meio dos receptores de glicoproteínas IIb/IIIa, à matriz subendotelial dos vasos lesionados e agregadas entre si. Após serem ativadas pelas substâncias agonistas, como a trombina e o colágeno, presentes na circulação e matriz subendotelial, as plaquetas liberam mediadores e proteínas adesivas que intensificam a adesão e agregação plaquetária e originam, posteriormente, o coágulo plaquetário. Em seguida, este coágulo é infiltrado por fibrina, formando uma rede, que juntamente com os eritrócitos, será responsável pela oclusão dos vasos sanguíneos, proteção contra microrganismos e organização da matriz celular provisória, necessária para a migração celular^{4,33}.

Os mediadores liberados das plaquetas, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador β (TGF- β), tromboxanos, fator de ativação plaquetária (PAF), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento um tipo insulina (IGF-1), também participam nos demais eventos da cicatrização, pois atuam na quimiotaxia das células inflamatórias (neutrófilos e monócitos) e na atração e proliferação endotelial, epitelial e fibroblástica^{4,32,33}.

A vasoconstrição produzida com o intuito de minimizar a hemorragia local, provoca, em poucos minutos, acidose e hipóxia tecidual, as quais desencadeiam a produção de óxido nítrico, adenosina e outros metabólitos vasoativos. Estes, por sua vez, causam a dilatação dos vasos próximos à ferida. Do mesmo modo, a histamina, oriunda dos mastócitos, estimula a vasodilatação, além de permitir a permeabilidade celular. Estes acontecimentos vasculares propiciam a entrada das células inflamatórias na MEC provisória e o aparecimento dos sinais cardinais da inflamação: rubor, calor e edema²⁹.

As primeiras células inflamatórias atraídas para a ferida são os neutrófilos, que atuam na eliminação de microrganismos, células mortas e corpos estranhos nas primeiras 48 horas. Assim como as plaquetas, as bactérias presentes na lesão liberam agentes quimiotáticos à células polimorfonucleares e, portanto, intensificam o recrutamento celular. Os neutrófilos apresentam três diferentes mecanismos de destruição: o primeiro consiste na fagocitose dos microrganismos e corpos estranhos; o segundo ocorre por meio da degranulação e liberação

de substâncias tóxicas, como a neutrófilo elastase, catepsina, protease e lactoferrina, aos corpos estranhos e tecidos mortos; e o terceiro acontece pela produção de radicais livres derivados de oxigênio, que apresentam propriedade bactericida²⁹.

Os monócitos atraídos à lesão pelos leucotrienos B₄, PDGF, TGF- β , fator plaquetário IV e fragmentos de imunoglobulinas G, transformam-se nos macrófagos e, ao término das obrigações neutrofilicas, substituem gradativamente os neutrófilos, que sofrem apoptose ou são fagocitadas pelos seus substitutos. O papel dos macrófagos, na fase inflamatória, é concluir o debridamento e auxiliar a transição para a fase proliferativa, por meio da secreção de citocinas e fatores de crescimento, como TGF- β e PDGF. Estes, por sua vez, que atrairão células musculares lisas, endoteliais e fibroblastos para a lesão. A deficiência de monócitos e macrófagos causa importantes alterações no processo cicatricial, pois torna insuficiente o debridamento da lesão, retarda a proliferação fibroblástica, torna inadequada a angiogênese e diminui o processo de fibrose. Por esses motivos, os macrófagos são considerados as células mais importantes da fase inflamatória^{32,35}.

Esta primeira etapa da cicatrização deverá ser concluída em três dias nas feridas cirúrgicas ou agudas, cicatrizadas por primeira intenção. No entanto, a presença de bactérias ou tecidos necrosados prolongarão a inflamação e acarretarão o desgaste do paciente³⁶.

A fase proliferativa começa por volta do terceiro dia e prolonga-se até o 21º dia pós-injúria tecidual, sendo caracterizada pela angiogênese, fibroplasia e epitelização. É nesta fase que se inicia a formação da cicatriz. Os fibroblastos próximos à ferida são atraídos para o centro da MEC, onde sintetizam o colágeno responsável pela sustentação e força tênsil da ferida^{3,36}. À medida que a produção de colágeno aumenta, ocorre a fibroplasia, ou seja, há a substituição da MEC por um tecido conjuntivo com maior resistência e elasticidade³³. Um dia após a migração de fibroblastos, ocorre a entrada e proliferação de células endoteliais, oriundas de vasos intactos ou lesionados na MEC, com o objetivo de promover o desenvolvimento de novos capilares, os quais irão permitir o aporte de células, como macrófagos e fibroblastos, e nutrição ao tecido, além das trocas gasosas. A angiogenina, angiotropina, angiopectina 1, trombospondina, endotelina, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), TGF- β , baixa tensão de oxigênio, aumento no lactato e decréscimo no pH local são os fatores estimulantes da angiogênese nesta fase^{3,32,36,37}.

Com a ocorrência da fibroplasia, inicia-se a formação de um tecido de granulação edematoso e avermelhado, constituído por macrófagos, vasos recém-formados e fibroblastos, depositados sobre um arcabouço frouxo de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipo I e III³³. Este tecido tem como função preencher e proteger a ferida, servir de superfície para

reepitelização e conter miofibroblastos responsáveis pela contração da lesão. Quando a deposição de colágeno na MEC atinge um nível ideal, a produção de colágeno é reduzida e, assim como as células endoteliais dos vasos neoformados, os fibroblastos sofrem apoptose, tornando o tecido de granulação numa cicatriz acelular³⁸.

Após a injúria tecidual, as células epidérmicas do estrato basal entram em processo mitótico e sofrem alterações fenotípicas, que permitem a sua movimentação em direção ao centro da ferida. Conforme essas células transitam e recobrem toda a MEC, é acionado o mecanismo de "inibição por contato", revertendo à normalidade o fenótipo das células epidérmicas localizadas no estrato basal³. Em feridas que não abrangem toda a espessura da pele, esse processo de reepitelização se inicia imediatamente após a lesão com a migração de células epiteliais da borda da ferida e de anexos. Em lesões profundas, a reepitelização só ocorre com as células epiteliais provenientes das margens da ferida e após a formação do tecido de granulação³⁶.

A fase de remodelação é a última e mais longa, com duração de meses ou anos. Esta etapa tem início na terceira semana e se caracteriza pela lise do colágeno tipo III e pelos processos sucessivos de produção, destruição e orientação das fibras de colágeno tipo I. Primeiramente, a deposição de colágeno I é realizada aleatoriamente e obedece a orientação e organização das fibronectinas e a direção da natureza das forças de tensão aplicadas sobre o tecido. Posteriormente, as metaloproteinases produzidas pelos macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e células epiteliais, digerem as fibras, que são ressintetizadas e organizadas conforme o sentido das fibras de tecido conjuntivo adjacente^{32,33,39}. As repetições desse processo resultam na formação de fibras de colágeno maiores e numa cicatriz com aparência mais uniforme^{32,40}. Quanto maior a organização e o número de ligações covalentes transversais entre as fibras, mais resistentes serão as cicatrizes. Ao término desta fase, observa-se uma regeneração limitada dos anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas, e uma cicatriz de coloração pálida com até 80% da força de tensão original^{29,33}.

Em pacientes desnutridos, haverá deficiência na deposição de colágeno e consequente retardo na finalização do processo cicatricial^{35,39}. Caso haja deposição excessiva de fibras de colágeno, decorrente de um desequilíbrio entre a sua produção e destruição, ocorrerá o desenvolvimento de cicatriz hipertrófica ou quelóides³⁹.

2.3.1. Tipos de cicatrização

Com base na classificação da ferida, o cirurgião poderá determinar qual melhor tipo de cicatrização a ser adotado². Existem três tipos de reparo tecidual: por primeira, segunda e terceira intenção³⁵.

Detalhadamente, na cicatrização por primeira intenção, realiza-se a coaptação por meio de suturas, adesivos, colas ou grampos das bordas das feridas criadas com menos de 24 horas. Para adoção dessa técnica, é necessário que o leito da lesão se apresente limpo e que as bordas estejam próximas ou haja tecido suficiente que permita essa abordagem^{32,35,41}. O reparo tecidual ocorre de forma rápida, apropriada e sem complicações, pois existe um equilíbrio adequado em todas as fases do processo cicatricial, com satisfatório metabolismo de colágeno, proliferação celular e degradação da matriz extracelular. Como normalmente os agentes lesivos produzem apenas uma reduzida ruptura da camada epidérmica e pequena destruição de tecidos conjuntivo e epidérmico adjacentes, predomina, nesse tipo de cicatrização, a regeneração epitelial³².

A cicatrização por segunda intenção ocorre quando as bordas das feridas não podem ser aproximadas devido à perda excessiva de tecido. As feridas serão cicatrizadas abertas e ocorrerá a contração das margens e reepitelização após formação do tecido de granulação. Como a angiogênese e a reepitelização são mais prolongadas, tais feridas apresentam um maior tempo de cicatrização e, portanto, estão mais propensas a infecções^{3,39}. Comumente, este tipo de reparação é adotado para o tratamento de úlcera diabética, vascular ou de pressão, ou em pacientes com complicações, tais como infecções, deiscências, inadequada perfusão sanguínea ou imunossupressão, que impedem a correta cicatrização por primeira intenção^{35,41}.

A cicatrização por terceira intenção, também nomeada de "primeira intenção retardada", é utilizada quando o leito da lesão se apresenta infeccionado ou contaminado, porém, com quantidade suficiente de tecidos que permita a aproximação das bordas. Neste caso, a sutura será realizada após a reversão do quadro infeccioso da lesão³.

2.4. Diabetes Mellitus

2.4.1. Histórico

O DM é uma das principais endocrinopatias relatadas na medicina e medicina veterinária. As primeiras descrições desta doença, até então caracterizada pela poliúria, datam 1500 a.C.⁷. A denominação aceita até os dias atuais foi realizada pelo médico grego Arataeus

(80-138 d.C.), que se baseou no sabor adocicado presente na urina⁴². Entretanto, o reconhecido do DM como uma afecção aconteceu em 1812, após a fundação da revista científica *New England Journal of Medicine and Surgery*. Apesar disto, devido ao desconhecimento da prevalência, patogênese e tratamentos, os diabéticos, logo que diagnosticados, apresentavam uma sobrevida de semanas a meses, decorrente da não reposição insulínica, visto que os primeiros estudos sobre o emprego da insulina foram iniciados somente em 1921^{42,43}.

Experimentalmente, o relato inicial em cães ocorreu em 1889, quando esta espécie foi submetida a pancreatemia e apresentou poliúria, glicosúria e polidipsia. Neste estudo, deduziu-se que o pâncreas produzia um fator capaz de metabolizar a glicose presente no corpo e prevenir a hiperglicemia⁴³. Edward Albert Sharpey-Schafer, em 1910, hipotetizou que a deficiência de um produto originado no pâncreas seria responsável por essa endocrinopatia e o intitulou insulina. Em 1954 e 1965, a estrutura da insulina e da pró-insulina, seu precursor, foram descritas, respectivamente⁴⁴.

2.4.2. Anatomia e fisiologia pancreática

O pâncreas, no cão e no gato, é um órgão situado na porção cranial do abdome, constituído por um pequeno corpo central unido aos dois ramos, denominados de lobos pancreáticos direito e esquerdo. O corpo central se situa na curvatura formada entre o piloro e o duodeno, ao passo que entre a curvatura maior do estômago e o colón transversal, localiza-se o lobo esquerdo. A borda pancreática direita se encontra dentro do mesoduodeno, com íntima associação ao duodeno proximal^{5,45}.

Fisiologicamente, este órgão é considerado uma glândula com funções endócrinas e exócrinas. Seu parênquima é constituído 90% por ácinos exócrinos e 10% por ilhotas de Langerhans. O produto obtido do componente endócrino, os hormônios, é drenado para a veia porta hepática, enquanto que as substâncias produzidas na porção exócrinas são secretadas no duodeno proximal via ductos^{5,45,46}.

O pâncreas endócrino é composto pelas ilhotas de Langerhans, que estão dispostas por todo órgão e são caracterizadas pela reduzida capacidade regenerativa. Estas ilhotas são pequenos agrupamentos celulares, que secretam diferentes produtos, de acordo com a sua constituição. Há quatro tipos celulares de ilhotas: as células β , secretoras de insulina, que estão localizadas centralmente e correspondem a 80% do pâncreas exócrino; as células α , secretoras de glucagon, distribuídas periféricamente e responsáveis por 20% da parte

exócrina; as células Δ , secretoras de somatostatina, situadas entre as α e β e presentes em menor número; e as células PP, secretoras de polipeptídeo pancreático^{46,47}.

2.4.3. Definição e classificação

O DM é um distúrbio metabólico, crônico, singularizado pela presença da hiperglicemia persistente, decorrente de falhas na secreção da insulina e/ou resistência à estimulação da mesma⁹⁻¹¹. O grau e as consequências desse desequilíbrio glicêmico estão diretamente relacionados à severidade do processo metabólico subjacente e são evidenciados por meio de lesões, disfunções e falências em diversos órgãos, como olhos, vasos sanguíneos e cérebro. Acrescentam-se ainda as anormalidades no metabolismo de proteínas, carboidratos e gorduras¹⁰.

Os principais sinais clínicos observados em pequenos animais são a polifagia, poliúria, polidipsia e o emagrecimento progressivo. Tais alterações são decorrentes da deficiência insulínica que ocasiona a redução na utilização tecidual da glicose, dos aminoácidos e dos ácidos graxos, e estimula à glicogeneogênese e glicogenólise hepática. Ademais, perpetua a hiperglicemia que suscita a glicosúria secundária à extrapolação da capacidade renal de reabsorção da glicose. A presença deste carboidrato na urina gera a poliúria por meio da diurese osmótica e, de forma compensatória, verifica-se a presença da polidipsia. Por fim, a polifagia é resultante da não inibição do centro da fome, localizado no hipotálamo, em virtude da incapacidade da glicose penetrar nas células do centro da saciedade⁴⁵.

Na medicina, a classificação e os critérios de diagnóstico desta afecção têm acompanhado os resultados obtidos com pesquisas, principalmente no que concerne à fisiopatologia e epidemiologia⁸. Na medicina veterinária, embora não se compreenda inteiramente os mecanismos etiopatogênicos, tradicionalmente, usa-se como guia para identificação e classificação o esquema médico proposto pela American Diabetes Association (ADA). Com base nisto, nota-se semelhança entre o DM tipo I em humanos com o DM em cão, ao mesmo tempo em que se relaciona o tipo II com o DM em gatos⁷.

a) Diabetes mellitus tipo I

O DM em caninos é caracterizado por uma perda expressiva de células β com consequente redução na quantidade de células que compõem as ilhotas endócrinas. Essa perda é o fator primordial para o desenvolvimento desta doença, que se manifesta tardiamente, em geral aos oito anos de idade, e que apresenta uma origem heterogênea^{48,49}. Em cães jovens, a hipoplasia e aplasia de ilhotas pancreáticas com deficiência de células β podem culminar no desenvolvimento de um tipo incomum e mais severo de DM tipo I. Nos adultos, o aparecimento da doença está ligado às mudanças nas ilhotas e nas células β de pacientes com histórico de pancreatite e/ou contato com fatores ambientais, tais como medicações hipoglicemiantes e doenças antagonistas da insulina⁷. Há relatos de DM tipo I relacionada a fase de diestro em cadelas intactas⁴⁹.

No ser humano, essa endocrinopatia, que representa 5 a 10% dos casos de DM, acomete diferentes faixas etárias, com maior incidência entre adultos jovens, adolescentes e crianças. Nestas últimas, observa-se o aumento no número de relatos, principalmente em menores de cinco anos. Os sintomas comumente descritos são o emagrecimento progressivo e inexplicável, visão turva, poliúria, polidipsia e polifagia. Com base na fisiopatologia, o DM tipo I humano pode ser idiopática, ainda pouco compreendido, ou autoimune quando qualificado pela eliminação gradativa das células β e conseguinte ausência absoluta de insulina. Neste tipo, há a ocorrência da insulite autoimune secundária, associadas aos de fatores ambientais (infecciosos, dietéticos, tóxicos) e com a predisposição genética, que resulta em hiperglicemia persistente. Para a manutenção da vida, é necessária a adoção da insulino terapia⁸.

b) Diabetes mellitus tipo II

Este tipo de DM se origina a partir da resistência à ação da insulina nos tecidos alvos, como fígado, tecido adiposo e músculos, atrelado à secreção insuficiente deste hormônio secundária à disfunção e falência das células β pancreáticas⁷. Acredita-se que a obesidade, juntamente com a redução na sensibilidade tecidual à insulina, exija um aumento na secreção deste hormônio para a manutenção da normoglicemia. Entretanto, tal exigência, quando perpetuada, culmina com o esgotamento e morte das células β e consequente DM⁵⁰. Diante disso, cogita-se que fatores ambientais e genéticos sejam responsáveis pelo desenvolvimento desta endocrinopatia⁷.

Nos gatos, uma das possíveis explicações para a disfunção das células β é a deposição de amiloide nas ilhotas, o que ocasionaria a destruição das mesmas. Esta deposição

seria gerada pelo hormônio Polipeptídeo Amiloide das Ilhotas (IAPP), que é co-secretado com a insulina. A resistência tecidual à insulina estimularia cronicamente o aumento da secreção deste hormônio e, por conseguinte, a deposição de amiloide no pâncreas. Estudos recentes têm questionado se o amiloide seria uma causa ou consequência do DM tipo 2, visto que esta alteração foi observada em gatos diabéticos e normoglicêmicos. No momento, sabe-se que, quando presente, a deposição de amiloide causa o agravamento clínico do felino diabético⁷.

Sugere-se que o DM tipo 2 nos gatos seja uma doença poligênica⁷. Embora não existam pesquisas que afirmem tal suposição, a semelhança observada entre os fatores ambientais e a fisiopatologia com DM em humanos propõem uma possível similaridade entre as causas genéticas humanas e felinas, como observado em um estudo realizado em gatos de pelo curto, com excesso de peso, que depreendeu que o polimorfismo no gene do receptor 4 da melanocortina (MC4R) pode influenciar o desenvolvimento de DM em felinos, conforme o observado em humanos⁵¹.

O DM tipo 2 acomete 80% dos gatos diabéticos, geralmente do sexo masculino e com idade média de 11 anos. As principais raças acometidas são o Azul Russo, Gato Norueguês da floresta e o Abissínio. No entanto, dentre todas, a raça com maior predisposição é o Birmanês, que, além da resistência à insulina e dos fatores genéticos, tem o provável envolvimento da dislipidemia como agravante. Ademais, diferentes de outros gatos, o fator sexo não tem influência na incidência da doença e a menor propensão à deposição de amiloide e à pancreatite pode ser responsável pelo desenvolvimento mais tardio desta, afecção sbretudo quando comparado a outras raças. Ressalta-se que investigações científicas adicionais são necessárias para a compreensão de tais particularidades^{50,52}.

Os gatos das raças Bengal, Sagrado da Birmânia, Persa, Ragdoll e British Shorthair são os menos acometidos⁵². Essa diferença na suscetibilidade racial reforça o suposto caráter genético do DM tipo 2 e o incentivo às pesquisas que busquem também definir testes de risco genético para a identificação e manejo preventivo de indivíduos susceptíveis, uma vez que é crescente o número de felinos diabéticos, decorrente, dentre outros motivos, do aperfeiçoamento da medicina veterinária no que tange ao diagnóstico, prognóstico e tratamento, somado ao interesse dos proprietários e ao aumento na expectativa de vida dos felinos domésticos^{51,52}.

Relatos dessa endocrinopatia em caninos e equinos são raros^{7,53}. Nos cavalos, um dos motivos para a escassez de informação é o tempo de vida relativamente curto do animal. No entanto, quando diagnosticado, o paciente geralmente é idoso e apresenta este quadro clínico secundário à resistência à insulina e à Síndrome Metabólica Equina⁵³.

Em humanos, o DM tipo 2 é secundário à falha na ação e secreção da insulina, sem a presença de destruição auto-imune das células β pancreáticas. Atinge 90 a 95% dos diabéticos em qualquer faixa etária, mas, principalmente, após os 40 anos. Relata-se o acometimento de mulheres com histórico de diabetes gestacional e determinados subgrupos étnicos, mas a grande parte dos portadores apresentam sobrepeso, obesidade ou acúmulo de gordura abdominal associado ao peso normal. Condições como excesso de peso, envelhecimento e sedentarismo representam fatores de risco. Frequentemente, a hipertensão arterial e a dislipidemia são diagnosticadas associadas a esta endocrinopatia. Todavia, quadros de cetoacidose são incomuns. Os sintomas clássicos do DM tipo 2 tardam a serem percebidos devido à progressão gradativa da hiperglicemia. Entretanto, pacientes nesta situação tendem um grande perigo em manifestar complicações micro e macrovasculares^{8,10}.

2.4.4. Cicatrização em pacientes diabéticos

O processo de cicatrização obtém por meio da participação coordenada das citocinas, MEC, fatores de crescimento e diferentes tipos celulares, a restauração da integridade tecidual. Este evento perpassa, em tem hábil, as fases da inflamação, proliferação e remodelação². No DM, observa-se o prejuízo e o retardo em todos estágios da reparação, secundários a vários mecanismos, dentre eles a hiperglicemia, disfunções macro e microcirculatórias, hipóxia, inflamação crônica e neuropatia sensorial e autonômica¹⁴.

O paciente diabético com inteireza dérmica se apresenta num estado pró-inflamatório crônico de baixo grau, caracterizado pelo aumento no número de células inflamatórias e incremento na expressão extracelular de metaloproteinasas de matriz-9 (MMP-9) e intracelular de proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B). Inicialmente, esta alteração se limita à pele para posteriormente tornasse sistêmica⁵⁴⁻⁵⁶.

Após a injúria, observa-se a incapacidade do organismo em desenvolver uma resposta inflamatória apropriada, uma vez que há o estabelecimento de um processo inflamatório crônico no sítio da lesão, evidenciado pelo acréscimo no infiltrado leucocitário decorrente do aumento de macrófagos e neutrófilos, que somado à ativação celular imune de forma irregular ou insuficiente e à expressão contínua de citocinas pró-inflamatórias, tais como Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), interleucinas-1(IL-1), interleucinas-6 (IL-6), interleucinas-8 (IL-8)⁵⁵⁻⁵⁷.

Outra importante alteração é o decréscimo na proliferação e migração dos fibroblastos, unido a instalação de um microambiente pró-apoptótico, que, juntos, diminuem a

quantidade destas células na ferida e, conseqüentemente, limitam a formação do tecido conjuntivo e o avanço da cicatrização⁵⁵. Semelhantemente, verifica-se o detrimento na capacidade proliferativa e migratória dos queratinócitos¹⁴.

Sabe-se que para a conclusão do reparo tecidual é essencial haver um balanço na ação das proteases e seus inibidores. No entanto, como nos demais mecanismos do processo cicatricial, há um prejuízo neste balanço, comprovado pelos altos níveis de metaloproteinases de matriz-1 (MMP-1), metaloproteinases de matriz-2 (MMP-2), metaloproteinases de matriz-8 (MMP-8) e MMP-9 e redução nos inibidores de metaloproteinases de matriz-1 (TIMP-1) e inibidores de metaloproteinases de matriz-2 (TIMP-2), encontrados principalmente nos fluidos de úlceras crônicas^{54,58}. Esta produção acentuada de metaloproteinases, acompanhada da presença expressiva de PTP1B e da glicação dos fatores de crescimento, são responsáveis pela inativação e resistência local à ação dos fatores de crescimento participantes da cicatrização⁵⁴.

O aumento da glicemia é responsável pela formação endógena e dificuldade de degradação e eliminação dos produtos de glicação avançada (AGEs) nos diabéticos, que estão diretamente relacionados às complicações vasculares, uma vez que exercem seus efeitos deletérios sobre o sistema circulatório. A deficiência na macro e microcirculação local resulta em danos celulares e teciduais, e intensificam o retardado cicatricial pelo decréscimo da oxigenação e nutrição nos tecidos feridos. O dano celular ocorre por meio de alterações na transcrição gênica, na sinalização entre a matriz extracelular e as células, e pelas mudanças nas proteínas ou lipídeos plasmáticos. Portanto, o acréscimo persistente na glicose sanguínea é o principal desencadeador de complicações macrovasculares, microvasculares e dos distúrbios metabólicos no diabético. Neste caso, uma das principais formas de prevenção é o controle glicêmico^{59,60}. Outras vias relacionadas à hiperglicemia, as quais resultam em disfunções endoteliais descritas em diabéticos são a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROSs), via do polioliol, via da hexosamina e a ativação da Proteína Quinase C⁶¹.

Também, como consequência do descontrole glicêmico, ocorre a neuropatia diabética que é singularizada pelas lesões progressivas das fibras somáticas (sensitivas e motoras) e autonômicas. Este quadro é derivado dos danos microvascular endoneural, que estão associados às modificações na atividade celular neuronal e endotelial, devido à entrada excessiva de glicose nestas células. A patogênese da neuropatia diabética envolve a ativação da via do polioliol, a síntese de AGEs e a redução do fluxo sanguíneo neural, com consequente isquemia ou hipóxia, e aumento da produção de radicais livres de oxigênio⁶⁰. Em pacientes humanos, relata-se a insensibilidade tátil, térmica e dolorosa, que resulta no desenvolvimento

de úlceras e deformidades, responsáveis pela amputação, principalmente, nos pés⁸. Em cães, as neuropatias raramente ocorrem⁶².

2.5. Quitosana

A quitina é um polissacarídeo de ocorrência natural, que é sintetizado na forma de miofibrilas cristalinas, ordenadas, presentes estruturalmente no exoesqueleto de artrópodes e na parede celular de fungos e leveduras. Sua principal finalidade é proporcionar rigidez e força a esses microrganismos. Devido à sua expressiva produção, a quitina é considerada o segundo biopolímero mais abundante no mundo. Contudo, apesar de estar presente em vários seres vivos pertencentes aos reinos animal e vegetal, a fonte de extração mais relevante e barata é o refugo da indústria pesqueira⁶³.

Esse polissacarídeo, por se tratar de um produto natural, cuja síntese não é submetida a um rigoroso controle genético, atrelado ao fato do objeto final não ser inteiramente puro e da extração de substâncias indesejáveis ser um processo laborioso, exhibe uma uniformidade inferior e incompatível com as exigências para determinadas aplicações. Ademais, devido à sua insolubilidade, o seu processamento, a caracterização e o emprego são lesados²¹. Com base nisto, encontra-se maior aplicabilidade à quitina quando esta é convertida para forma de quitosana, por meio da desacetilação parcial sob condições alcalinas ou por hidrólise enzimática^{63,64}.

A quitosana é um polímero que contém ao longo da sua cadeia aminas primárias, que possibilitam a sua interação com proteínas, células e organismos vivos e lhe conferem importantes propriedades físico-químicas, tais como viscosidade, solubilidade, mucoadesividade, comportamento polieletrólítico e capacidade para formar películas, que são dependentes do peso molecular e do grau de desacetilação da quitosana^{26,65}.

Por conta a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxicidade, esse polímero é considerada um novo tipo de material funcional com aplicações nas áreas alimentícia, biotecnológica, farmacêutica, agrícola, ambiental, ciência de materiais e terapia gênica²². Na medicina e medicina veterinária, a quitosana encontra ampla empregabilidade devido as suas propriedades antioxidante, antimicrobiana, angiogênica, hemostática e adjuvante na cicatrização²³⁻²⁵.

Diante destas relevantes especificidades e dos possíveis materiais obtidos, reconhece-se a quitosana como biomaterial bastante promissor, principalmente no que tange aos produtos relacionados com a cicatrização²⁶. Dentre eles estão as fibras, películas,

esponjas, grânulos, solução, membranas, hidrogéis, adesivos e veículos de liberação controlada de drogas⁶⁴.

No processo de cicatrização, verifica-se a colaboração em todas as fases, como observado no estudo que utilizou o gel esterilizado à base de quitosana em queimaduras de ratos. Neste experimento evidenciou o decréscimo no tempo de cicatrização pela participação na neovascularização, na proliferação tecidual e na redução do número de infiltrados de neutrófilos e TNF- α ⁶⁶. Ademais, relatou-se que o gel de quitosana a 2% em feridas cutâneas de ratas diabéticas otimizou a reepitelização e contração da ferida⁶⁷. No entanto, ressalta-se que a capacidade da quitosana em auxiliar este evento, seja por interferir na inflamação ou na ação de bactérias no leito da lesão, está diretamente relacionada ao seu grau de desacetilação, peso molecular, força iônica, pH do meio de dissolução e estado físico final⁶⁸. Portanto, acredita-se que o desenvolvimento de mais estudos acerca dos mecanismo de ação desse biopolímero auxiliará os interesses médicos e farmacêuticos²⁶.

REFERÊNCIAS

1. Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. 528p.
2. Pavletic MM. *Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery*. 3 ed. Massachusetts: Wiley-Blackwell; 2010. 697 p.
3. Tazima MFGS, Vicente YAMVA, Moriya T. *Biologia da ferida e cicatrização*. *Medicina*. 2008;41(3):259-64.
4. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin. Dermatol*. 2007;25(1):9-18.
5. Fossum TW. *Cirurgia de pequenos animais*. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 1314p.
6. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;94(3):311-21.
7. Nelson RW, Reusch CE. Animal Models of Disease: Classification and etiology of diabetes in dogs and cats. *J Endocrinol*. 2014;222(3):1-9.
8. Cobas RA, Gomes MdB. Diabetes Mellitus. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2010;9(Suplem 1):69-75.
9. Minatel DG, Enwemeka CS, França SC, Frade MAC. Phototherapy (LEDs 660/890nm) in the treatment of leg ulcers in diabetic patients: case study. *An Bras Dermatol*. 2009;84(3):279-83.
10. Association AD. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33(Suppl 1):S62–S69.
11. Zhang C, Ponugoti B, Tian C, Xu F, Tarapore R, Batres A, Alsadun S, Lim J, Dong G, Graves DT. FOXO1 differentially regulates both normal and diabetic wound healing. *J Cell Biol*. 2015;209(2):289-303.
12. Li Q, Kao H, Matros E, Peng C, Murphy GF, Guo L. Pulsed radiofrequency energy accelerates wound healing in diabetic mice. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(6):2255-62.
13. Wang W, Lin S, Xiao Y, Huang Y, Tan Y, Cai L, X L. Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats. *Life Sci*. 2008;82(3-4):190-204.
14. Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Adv Ther*. 2014;31(8):817-36.
15. Francis-Goforth KN, Harken AH, Saba JD. Normalization of diabetic wound healing. *Surgery*. 2010;147(3):446-9.

16. Goldberg SR, Diegelmann RF. Wound healing primer. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2012;24(2):165-78.
17. Kilik R, Lakyova L, Sabo J, Kruzliak P, Lacjakova K, Vasilenko T, et al. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and diabetic rats. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1-9.
18. Kumar P, Kumari RR, Kumar M, Kumar S, Chakrabarti A. Current practices and research updates on diabetes mellitus in canine. *Veterinary World.* 2014;7:952-9.
19. Simas SM. O tratamento de feridas cutâneas em cães e gatos. [Monografia] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária; 2012.
20. Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv.* 2011;29(3):322-37.
21. Campana-Filho SP, Brito D, Curti E, Abreu FR, Cardoso MB, Battisti MV, Sim PC, Goy RC, Signin R, Lavall RL. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. *Química Nova.* 2007;30(3):644-50.
22. Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra DC, Lia Fook MV, Costa ACFM. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos.* 2007;2(3):27-34.
23. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(10):1467-80.
24. Cardenas G, Anaya P, von Plessing C, Rojas C, Sepulveda J. Chitosan composite films. Biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(6):2397-405.
25. Honarkar H, Barikani M. Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatsh Chem.* 2009;140(12):1403-20.
26. Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur Polym J.* 2013;49(4):780-92.
27. Souza TM, Figuera RA, Kommers GD, Barros CSL. Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. *Pesqui Vet Bras.* 2009;29(2):177-90.
28. Timmons J. Skin function and wound healing physiology. *Wound Essentials.* 2006;1:8-17.
29. Harper D, Young A, McNaught CE. The physiology of wound healing. *Surgery.* 2014;32(9):445-50.
30. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care.* 2012;25(7):304-14.

31. Wild T, Rahbarnia A, Kellner M, Sobotka L, Eberlein T. Basics in nutrition and wound healing. *Nutrition*. 2010;26(9):862-6.
32. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery*. 2008;26(2):31-7.
33. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005;41:42
34. Isaac C, Ladeira PRS, Rêgo FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Rev Med*. 2010;89(3/4):125-31.
35. Beldon P. Basic science of wound healing. *Surgery*. 2010;28(9):409-12.
36. Williams J, Moores A. Manual de feridas em cães e gatos. 2 ed. São Paulo: Roca; 2013. 276p.
37. Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Aspectos celulares da cicatrização. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2009;84(3):257-62.
38. Osborn DA, Williams TR, Craig BM. Cesarean scar pregnancy: sonographic and magnetic resonance imaging findings, complications, and treatment. *J Ultrasound Med*. 2012;31(9):1449-56.
39. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2011;19(3):441-53.
40. Campos ACL, Branco AB, Groth AK. Cicatrização de feridas. *Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva*. 2007;20(1):51-8.
41. Kujath P, Michelsen A. Wound-from physiology to wound dressing. *Dtsch Arztebl Int*. 2008;105(13):239-48.
42. Polonsky KS. The past 200 years in diabetes. *N Engl J Med*. 2012;367(14):1332-40.
43. Catchpole B, Kennedy LJ, Davison LJ, Ollier WE. Canine diabetes mellitus: from phenotype to genotype. *J Small Anim Pract*. 2008;49(1):4-10.
44. Castejon F, Fraile A, Ponz F. Fundamentos de fisiologia animal. Pamplona: Ediciones Universidad de Navarra; 1979. 592 p.
45. Nelson WR, Couto, CG. Medicina Interna de Pequenos Animais. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. 1468 p.
46. Colville T, Bassert JM. Anatomia e Fisiologia Clínica para Medicina Veterinária. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. 568 p.
47. Engelking LR. Fisiologia Endócrina e Metabólica em Medicina Veterinária. São Paulo: Roca; 2010. 184 p.
48. Ahlgren KM, Fall T, Landegren N, Grimelius L, von Euler H, Sundberg K, et al. Lack of evidence for a role of islet autoimmunity in the aetiology of canine diabetes mellitus. *Plos One*. 2014;9(8):e105473.
49. Catchpole B, Ristic JM, Fleeman LM, Davison LJ. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks. *Diabetologia*. 2005;48(10):1948-56.

50. Lederer R, Rand JS, Jonsson NN, Hughes IP, Morton JM. Frequency of feline diabetes mellitus and breed predisposition in domestic cats in Australia. *Vet J.* 2009;179(2):254-8.
51. Forcada Y, Holder A, Church DB, Catchpole B. A polymorphism in the melanocortin 4 receptor gene (MC4R:c.92C>T) is associated with diabetes mellitus in overweight domestic shorthaired cats. *J Vet Intern Med.* 2014;28(2):458-64.
52. Öhlund M, Fall T, Ström Holst B, Hansson-Hamlin H, Bonnett B, Egenvall A. Incidence of diabetes mellitus in insured swedish cats in relation to age, breed and sex. *J Vet Intern Med.* 2015;29(5):1342-7.
53. Johnson PJ, Wiedmeyer CE, LaCarrubba A, Ganjam VK, Messer NT. Diabetes, insulin resistance, and metabolic syndrome in horses. *J Diabetes Sci Technol.* 2012;6(3):534-40.
54. Dinh T, Tecilazich F, Kafanas A, Doupis J, Gnardellis C, Leal E, Tellechea A, Pradhan L, Lyons TE, Giurini JM, Veves A. Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration. *Diabetes.* 2012;61(11):2937-47.
55. Desta T, Li J, Chino T, Graves D. Altered Fibroblast Proliferation and Apoptosis in Diabetic Gingival Wounds. *J Dent Res.* 2010;89(6):609-14.
56. Tellechea A, Kafanas A, Leal EC, Tecilazich F, Kuchibhotla S, Auster ME, Kontoes I, Paolino J, Carvalho E, Nabzdyk LP, Veves A. Increased skin inflammation and blood vessel density in human and experimental diabetes. *Int J Low Extrem Wounds.* 2013;12(1):4-11.
57. Nabzdyk LP, Kuchibhotla S, Guthrie P, Chun M, Auster ME, Nabzdyk C, Deso S, Andersen N, LoGerfo FW, Veves A. Expression of neuropeptides and cytokines in a rabbit model of diabetic neuroischemic wound-healing. *J Vasc Surg.* 2013;58(3):766-75.
58. Martins VL, Caley M, O'Toole EA. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res.* 2013;351(2):255-68.
59. Araszkiwicz A, Naskret D, Niedzwiecki P, Samborski P, Wierusz-Wysocka B, Zozulinska-Ziolkiewicz D. Increased accumulation of skin advanced glycation end products is associated with microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 2011;13(8):837-42.
60. Ferreira LT, Saviolli IH, Valenti VE, Abreu LC. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. *Arquivos Brasileiros de Ciência da Saúde.* 2011;36(3):182-8.
61. Funk SD, Yurdagul AJ, Orr AW. Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis: lessons from type 1 diabetes. *Int J Vasc Med.* 2012;1-19.
62. Catchpole B, Adams JP, Holder AL, Short AD, Ollier WE, Kennedy LJ. Genetics of canine diabetes mellitus: are the diabetes susceptibility genes identified in humans involved in breed susceptibility to diabetes mellitus in dogs. *Vet J.* 2013;195(2):139-47.
63. Jayakumar Ra, Menon Da, Manzoor Ka, Nair SVa, Tamura Hb. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - A short review. *Carbohydrate Polymers.* 2009;82:227-32.

64. Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs*. 2015;13(3):1133-74.
65. Shukla SK, Mishra AK, Arotiba OA, Mamba BB. Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review. *Int J Biol Macromol*. 2013;59(1):46-58.
66. Mayol L, De Stefano D, Campani V, De Falco F, Ferrari E, Cencetti C, Matricardi P, Maiuri L, Carnuccio R, Gallo A, Maiuri MC, De Rosa G. Design and characterization of a chitosan physical gel promoting wound healing in mice. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(6):1483-93.
67. Dias TA. Gel de quitosana a 2% na cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas.[Dissertação] Goiânia: Universidade Federal de Goiás; Escola de Veterinária e Zootecnia. 2012.
68. Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9(7):857-79.

CAPÍTULO 2 - *Spray* de quitosana na cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas.

O segundo capítulo foi escrito em forma de artigo científico e está formatado conforme as normas da revista *Ciência Animal Brasileira* (Anexo A).

SPRAY QUITOSANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATAS DIABÉTICAS

Resumo

A cicatrização é um evento complexo e dinâmico que visa a restauração da integridade tecidual. No entanto, alguns fatores, como o diabetes, podem prejudicar este evento fisiológico. A quitosana, um derivado da quitina, tem sido cogitada como uma opção versátil e eficaz para o tratamento de feridas. O presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar o efeito do gel de quitosana a 2% e spray à base de quitosana na cicatrização por segunda intenção de feridas cutâneas em ratas diabéticas. Foram utilizadas 54 ratas divididas, aleatoriamente, em três grupos: grupo controle (GC) grupo gel de quitosana a 2% (GG) e grupo spray de quitosana (GS) com 18 animais, cada. As análises macroscópicas mostraram que ao 14º dia, o gel de quitosana 2% e o spray de quitosana proporcionaram uma taxa de contração de 100% e 99%, respectivamente. A nível histológico, observou-se o recrutamento antecipado de células mononucleares, fibroblasia e deposição de tecido fibrovascular denso acentuados e fibrose nas feridas dos GG e GS, enfatizando a capacidade deste biopolímero em otimizar a cicatrização de diabéticos. Podendo, portanto, ser uma opção terapêutica como também a base para o desenvolvimento de outras formulações que proporcionem a reparação de feridas em pacientes diabéticos.

Palavras-chave: Curativo, Diabetes, Hidrogel, Polissacarídeo, Quitina

CHITOSAN SPRAY ON THE HEALING OF SKIN WOUND IN DIABETIC RATS

Abstract

The healing is a complex and dynamic event aimed at the restoration of tissue integrity. However, some factors, such as diabetes, can harm this physiological event. Chitosan, a derivative of chitin, has been considered as a versatile and effective option for the treatment of wounds. This study aimed to evaluate and compare the effect of chitosan 2% gel and chitosan spray based on secondary intention healing of skin wounds in diabetic rats. 54 rats were used divided randomly into three groups: control group (CG) chitosan 2% gel group (GG) and chitosan spray group (GS) with 18 animals each. Macroscopic analysis showed that after 14 days, the chitosan 2% gel of and chitosan spray gave a contraction rate of 100% and 99%, respectively. At the histological level, there was the anticipated recruitment of mononuclear cells, fibroblasia and deposition of dense fibrovascular tissue marked and fibrosis in the wounds of GG and GS, emphasizing the ability of this biopolymer to optimize the healing of diabetic. It can therefore be a therapeutic option for the development of other formulations that provide wound repair in diabetic patients.

Keywords: Curative, Diabetes, Hydrogel, Polysaccharide, Chitin

Introdução

O processo cicatricial é um fenômeno complexo e dinâmico que visa à restauração tecidual em tempo hábil, envolvendo as fases de inflamação, proliferação e maturação/remodelação^{1,2}. No entanto, condições locais, extrínsecas e intrínsecas, como a presença de sujidades, infecção, radioterapia, quimioterapia, desnutrição e diabetes mellitus, podem prejudicar o reestabelecimento da normalidade, constituindo um desafio médico a ser superado^{3,4}.

O Diabetes Mellitus (DM) é uma das principais endocrinopatias relatada na Medicina e Medicina Veterinária, evidenciado por um incremento expressivo no número de portadores dessa doença^{5,6}. Na Medicina, esta doença é considerada um problema de saúde pública, visto que é alarmante o crescimento mundial no número de diabéticos, desencadeado principalmente, pelo sedentarismo e obesidade. Estima-se que, com um aumento anual médio de 2,7%, até 2030 existam mais de 500 milhões de pessoas com DM. Aspectos como urbanização, desenvolvimento econômico e envelhecimento estão cada vez mais relacionados ao DM, principalmente em países de baixa e média renda, onde os recursos destinados à saúde são mais escassos⁶. Estima-se que a taxa de prevalência do DM em cães e gatos é de 0,4-1,2%⁵.

Conceitualmente, essa afecção é definida como uma associação de distúrbios metabólicos crônicos, devido à presença da hiperglicemia persistente^{7,8}. As consequências desse desequilíbrio glicêmico são evidenciadas por meio de lesões, disfunções e falências em diversos órgãos como olhos, vasos sanguíneos e cérebro, que são desencadeadas pela macro e microangiopatia e/ou neuropatia, o que resulta em processos como feridas complexas e crônicas, especialmente nas extremidades inferiores⁸⁻¹⁰. O DM representa um dos principais elementos responsáveis pelo atraso em todos os estágios da cicatrização, visto que é referido pela redução da angiogênese e da formação e migração de fibroblastos, aumento e formação contínua de citocinas, além da diminuição na força de tensão da ferida¹¹⁻¹³. A deficiência na macro e microcirculação local intensifica o retardado cicatricial, por meio do decréscimo da oxigenação e nutrição nos tecidos feridos¹³.

Apesar dos recentes avanços das terapias complementares, como a otimização da nutrição, tratamentos à base de fatores de crescimento, curativos para feridas crônicas e substitutos sintéticos de pele, as condições de cicatrização anormal permanecem como um problema clínico significativo, causador de morbidade e mortalidade^{14,15}. Diante disso, é indispensável o desenvolvimento de novas opções terapêuticas, uma vez que os curativos atualmente disponíveis, como géis, ataduras, cremes e gazes são, na maioria das vezes, bastante onerosos¹⁶.

As três categorias de curativos empregadas rotineiramente na prática clínica são a biológica, a sintética e a biológica-sintética, as quais ainda não podem ser consideradas ideais, já que não reúnem todas as características necessárias para tanto¹⁷.

A quitosana, um derivado da quitina, tem sido cogitada como uma opção válida, versátil e eficaz para o tratamento de feridas¹⁷. A quitina é um polissacarídeo de ocorrência natural, presente estruturalmente no exoesqueleto de artrópodes e na parede celular de fungos e leveduras. Sua insolubilidade é um importante obstáculo no seu processamento, uso e caracterização. Portanto, a quitina apresenta maior aplicabilidade quando convertida à quitosana, por meio do processo de desacetilização parcial¹⁸.

Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxicidade, a quitosana é considerada um novo tipo de material funcional com aplicações nas áreas biotecnológica, farmacêutica, ciência de materiais e terapia gênica¹⁹. Este polissacarídeo tem sido investigado devido às suas propriedades antimicrobiana, angiogênica, hemostática e adjuvante na cicatrização, além de sua ampla versatilidade para a construção de biomateriais²⁰⁻²⁵. Diante destas especificidades, busca-se na quitosana um promissor aliado para o tratamento de feridas. Assim, objetivou-se, neste trabalho, avaliar e comparar o spray de quitosana e o gel de quitosana a 2% na cicatrização de feridas cutâneas de ratas diabéticas.

Material e Métodos

A execução de todas as etapas do projeto foi realizada conforme as recomendações éticas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), após aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás-UFG, sob protocolo nº 123/14.

O experimento foi realizado na Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ-UFG). Foram utilizadas 54 ratas Wistar, adultas, pesando entre 180-200g, as quais foram alojadas em gaiolas, contendo no máximo dois indivíduos, acomodadas numa sala do biotério da UFG. Fatores como temperatura ambiente, umidade relativa do ar, iluminação e presença de ruído foram mantidos em condições ideais. A água e ração foram oferecidas *ad libitum*. Após o período de adaptação de sete dias, os animais foram submetidos à indução experimental do DM. Para isso, inicialmente, realizou-se um jejum alimentar de 12 horas e, posteriormente, procedeu-se a aplicação intraperitoneal de aloxana (Sigma Aldrich®, EUA) na dose de 120mg/kg. Com 72 horas pós-procedimento, realizou-se a dosagem glicêmica de todas as ratas por meio do Kit comercial Contour TS (Bayer®). Foi considerado diabético todo animal com glicemia acima de 200 mg/dL. A fim de acompanhar o estado de

diabetes, a glicemia de cada animal foi aferida semanalmente. As amostras de sangue para a realização deste exame foram colhidas na veia lateral da cauda.

Após a confirmação do DM, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos composto por 18 animais, cada, de acordo com o tratamento recebido: GC (grupo controle), GG (grupo gel de quitosana 2%) e GS (grupo spray de quitosana). Os grupos foram subdivididos em três subgrupos com seis indivíduos, conforme os tempos experimentais pré-determinados para análise histológica da ferida (terceiro, sétimo e 14º dia). As ratas dos grupos GC, GG e GS tiveram suas feridas tratadas diariamente com 1ml de solução fisiológica 0,9%, 1ml gel de quitosana a 2% e 1ml de *spray* à base de quitosana (Quractiv® Derm spray), respectivamente. O gel de quitosana a 2% com grau de desacetilação de 85% foi manipulado pelo Laboratório de Biofarmácia e Farmacocinética (BiopK) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (FF/UFG) e o spray à base de quitosana utilizado foi desenvolvido pela empresa Medovent GmbH® (Mainz, Alemanha).

Para a confecção das feridas, as ratas receberam como protocolo anestésico Cetamina (80 mg/kg), Midazolam (3 mg/kg) e Cloridrato de Tramadol (2 mg/kg) via intraperitoneal como indução e isoflurano para manutenção do plano anestésico. Em seguida, com o animal em decúbito ventral, realizaram-se a tricotomia e antissepsia da região dorsal às vértebras torácicas. As feridas cutâneas foram feitas com o auxílio de punch para biópsia de 9,0 mm, retirando-se um fragmento da pele e tecido subcutâneo, deixando exposta a fáscia muscular dorsal. Após a hemostasia local com gazes esterilizadas, as áreas lesadas receberam o tratamento conforme o grupo e período estabelecidos. Como protocolo analgésico, administrou-se Cloridrato de Tramadol (2mg/kg/VO) diariamente, durante os três primeiros dias pós cirúrgicos.

A administração dos tratamentos ocorreu após o procedimento cirúrgico e a cada 24 horas. As lesões foram fotografadas após a cirurgia e a cada 48 horas, com uma câmera digital mantida a 15 cm de distância. As áreas das imagens obtidas foram mensuradas em cm² por meio do software Image J®.

Ao final do período de tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia por overdose de isoflurano. Os fragmentos constituídos pelas áreas das lesões cutâneas foram coletados obedecendo uma margem de segurança de 1cm e fixados em solução de formol tamponado a 10%. Lâminas histológicas foram preparadas e coradas pela técnica de hematoxilina eosina (HE) para análise histológica dos tecidos.

Em relação à epiderme, foram avaliados os parâmetros crosta e reepitelização. Para a crosta foi atribuída a classificação presente ou ausente, enquanto que para a reepitelização, os

escores ausente, parcial e total. Células mononucleares, polimorfonucleares, fibroplasia, tecido fibrovascular frouxo e denso, fibrose e neovascularização foram examinados na derme. Para a neovascularização, utilizou-se a média do número de vasos em cada grupo, ao passo que nos demais parâmetros foram concedidos os escores 0 (ausente), 1 (discreto, 1 a 25% do campo), 2 (moderado, 26 a 50% do campo) e 3 (acentuado, 51 a 100% do campo).

Os dados quantitativos referentes à redução da área das feridas foram analisados por Análise de Variância (ANOVA). Sendo a ANOVA significativa, procedeu-se o teste Scott-Knott para duas médias. Na avaliação microscópica, empregou-se o teste Kruskal-Wallis. Para a realização das análises estatísticas, utilizou-se o software Assistat e em todas as análises um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado.

Resultados

A análise macroscópica das feridas mostrou que nos animais dos grupos GG e GS ocorreram, nos quatro primeiros dias, as melhores taxas de contração, com valores próximos aos 51%. (Figura 1). No 14º dia pós-operatório, os grupos GG e GS tiveram uma redução significativa na área da lesão (Figura 2), diferindo estatisticamente do GC (Tabela 1). Diferença estatística entre os grupos GG e GS não foi observada.

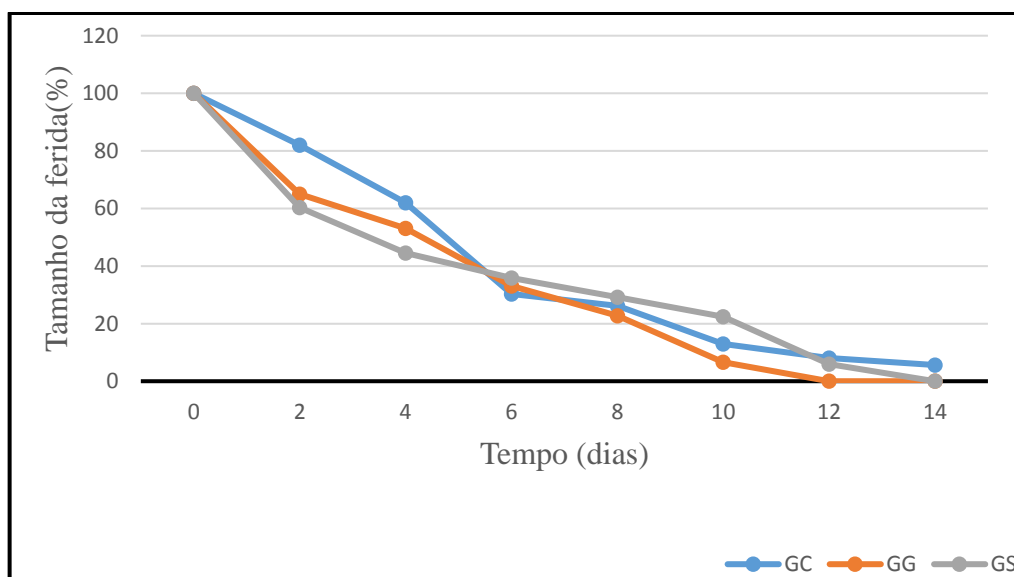


FIGURA 1 - Gráfico representativo da evolução da redução de feridas cutâneas em ratos Wistar diabéticos tratadas com solução salina 0,9% (GC), gel de quitosana a 2% (GG) e spray de quitosana (GS).

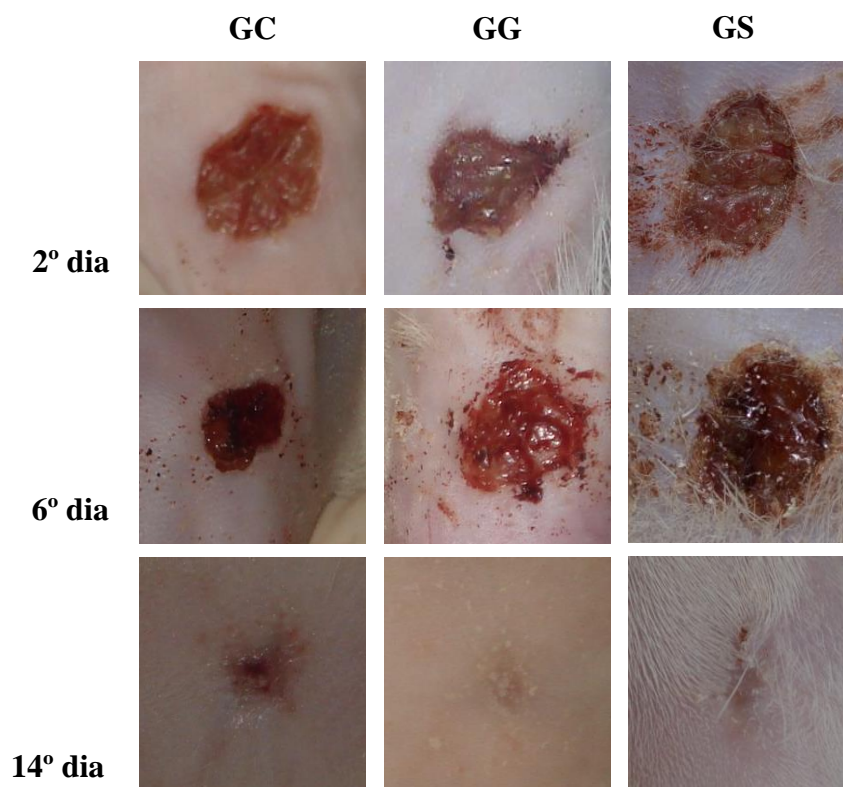


FIGURA 2 - Evolução macroscópica da contração de feridas em ratas diabéticas ao segundo, sexto e 14º dia pós-cirúrgico no GC (controle), GG (gel de quitosana a 2%) e GS (spray de quitosana).

TABELA 1 - Porcentagem de contração média das feridas cutâneas de ratas Wistar diabéticas tratadas com solução salina 0,9% (GC), gel de quitosana a 2% (GG), e spray de quitosana (GS) ao 14º dia pós-operatório.

GRUPO	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO
GC	94,29 ± 4,85 ^b
GG	100 ± 0 ^a
GS	99,95 ± 0,10 ^a

a e b indicam diferença estatística entre os grupos. Nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Na epiderme de todos os grupos, observou-se, ao terceiro dia pós-operatório, a presença de crosta e a ausência de reepitelização, enquanto que ao sétimo dia, foi possível evidenciar reepitelização parcial associada à persistência de crostas. Ao 14º dia, notou-se a ocorrência da reepitelização total (Figura 3). Não houve diferença estatística nestes parâmetros.

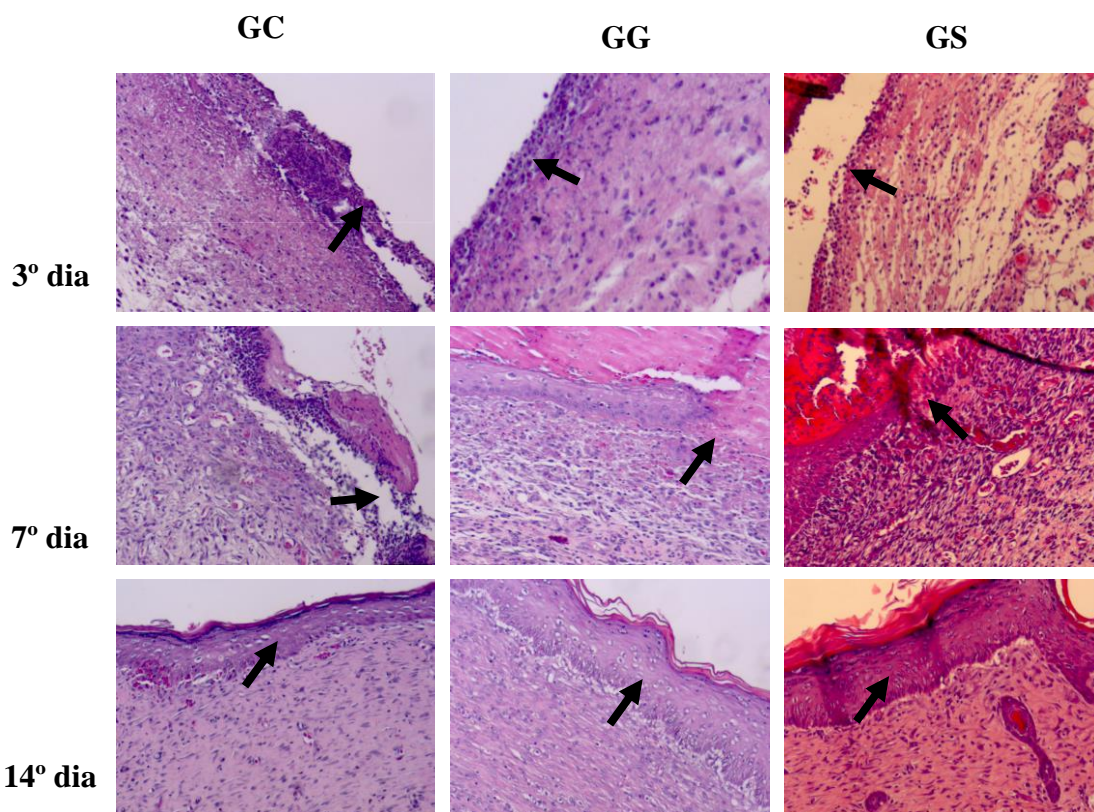


FIGURA 3 - Fotomicrografias da epiderme de feridas cutâneas de ratas diabéticas (HE, 20X). Reepitelização ausente (seta preta) ao terceiro dia pós-operatório nos animais GC (grupo controle), GG (gel de quitosana a 2%) e GS (spray de quitosana). Reepitelização parcial (seta preta) nos animais GC, GG e GS no sétimo dia pós-operatório. Reepitelização total (seta preta) ao 14º dia pós-operatório nos animais GC, GG e GS.

Ao terceiro dia pós-operatório, constatou-se de forma acentuada a presença de polimorfonucleares na derme superficial e de forma discreta na derme profunda, em todos os grupos. As células mononucleares, na derme superior, estiveram ausentes nos GC e GG e no GS estas se apresentaram discretas. De forma moderada, evidenciou-se a presença destas células na camada profunda do GG e GS, enquanto que no GC este critério se mostrou discreto. Tal achado resultou em diferença estatística entre o GS e GC. Neste tempo experimental, a ocorrência de fibroplasia e tecido fibrovascular frouxo foi constatada somente na derme profunda e com escore discreto nos três tratamentos. No parâmetro neovascularização, não houve diferença estatística entre os grupos (Tabela 2).

TABELA 2 - Parâmetros microscópicas avaliados na derme superficial e profunda de ratas Wistar diabéticas tratados com solução salina 0,9% (GC), gel de quitosana a 2% (GG) e spray de quitosana (GS) no terceiro dia pós-operatório

GRUPO	REGIÃO	PMN	MN	FIBROP	TFVF	TFVD	FIBROSE	NV
GC	Superficial	3	0 ^b	0	0	0	0	9,63
	Profunda	1	1 ^d	1	1	0	0	
GG	Superficial	3	0 ^b	0	0	0	0	10,9
	Profunda	1	2	1	1	0	0	
GS	Superficial	3	1 ^a	0	0	0	0	6,2
	Profunda	1	2 ^c	1	1	0	0	

GC: grupo controle; GG: grupo gel de quitosana a 2%; GS: grupo spray de quitosana; PMN: células polimorfonucleares; MN: células mononucleares; FIBROSE: fibroplasia; TFVF: tecido fibrovascular frouxo; TFVD: tecido fibrovascular denso; NV: neovascularização (média de vasos presentes). Escores: 0=ausente; 1= discreto; 2=moderado; 3= acentuado. Números seguidos por letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

As células polimorfonucleares e mononucleares na camada superficial da derme, aos sete dias, nos grupos GC e GS estavam acentuadas, enquanto que no GG se apresentaram moderadas. Na derme profunda, em todos os tratamentos, a presença das células polimorfonucleares obteve escore discreto. Constatou-se diferença estatística entre o GS e os demais com relação aos mononucleares, uma vez que no GC e GG, estas células se mantiveram de forma moderada e no GS intensa. A ocorrência de fibroplasia e tecido fibrovascular frouxo na camada superficial da derme foi classificada como moderada no GC e intensa no GG e GS. Diante disso, notou-se em ambos os parâmetros diferença estatística entre o GC e os outros dois grupos. Na derme profunda, tal resultado foi observado em relação à fibroplasia. O tecido fibrovascular frouxo esteve moderado no GC e GG e intenso no GS nesta camada. Não foi constatada diferença estatística entre os grupos no item neovascularização. Apesar disso, o grupo GS obteve média de vasos maior (17,96) que a dos demais tratamentos (Tabela 3).

No 14º dia pós-operatório, notou-se, em todos os tratamentos, a inexistência de células polimorfonucleares e tecido fibrovascular frouxo. Constatou-se também a presença discreta de mononucleares na derme superficial dos três grupos e na profunda do GC e GG. A presença moderada de mononucleares na camada profunda do GS resultou em diferença estatística entre este e os grupos GC e GG. O tecido fibrovascular denso esteve intenso nas duas camadas da derme nos grupos GC e GS e discreta no GG. A fibrose foi observada na derme superficial dos GG e GS de forma discreta e ausente no GC. Na neovascularização não ocorreu diferença estatística (Tabela 4).

TABELA 3 - Parâmetros microscópicas avaliados na derme superficial e profunda de ratas Wistar diabéticas tratados com solução salina 0,9% (GC), gel de quitosana a 2% (GG) e spray de quitosana (GS) no sétimo dia pós-operatório

GRUPO	REGIÃO	PMN	MN	FIBROP	TFVF	TFVD	FIBROSE	NV
GC	Superficial	3	3	2 ^a	2 ^a	0	0	14,4
	Profunda	1	2 ^a	2 ^c	2 ^c	0	0	
GG	Superficial	2	2	3 ^b	3 ^b	0	0	12,63
	Profunda	1	2 ^a	3 ^d	2	0	0	
GS	Superficial	3	3	3 ^b	3 ^b	0	0	17,96
	Profunda	1	3 ^b	3 ^d	3 ^d	0	0	

GC: grupo controle; GG: grupo gel de quitosana a 2%; GS: grupo spray de quitosana; PMN: células polimorfonucleares; MN: células mononucleares; FIBROSE: fibroplasia; TFVF: tecido fibrovascular frouxo; TFVD: tecido fibrovascular denso; NV: neovascularização (média de vasos presentes). Escores: 0=ausente; 1= discreto; 2=moderado; 3= acentuado. Números seguidos por letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

TABELA 4 - Parâmetros microscópicas avaliados na derme superficial e profunda de ratas Wistar diabéticas tratados com solução salina 0,9% (GC), gel de quitosana a 2% (GG) e spray de quitosana (GS) no 14º dia pós-operatório

GRUPO	REGIÃO	PMN	MN	FIBROP	TFVF	TFVD	FIBROSE	NV
GC	Superficial	0	1	2	0	3 ^b	0 ^a	13
	Profunda	0	1 ^a	2	0	3 ^b	0	
GG	Superficial	0	1	3	0	1 ^a	1 ^b	9,83
	Profunda	0	1 ^a	3	0	1 ^a	0	
GS	Superficial	0	1	3	0	3 ^b	1 ^b	15,12
	Profunda	0	2 ^b	3	0	3 ^b	0	

GC: grupo controle; GG: grupo gel de quitosana a 2%; GS: grupo spray de quitosana; PMN: células polimorfonucleares. MN: células mononucleares; FIBROSE: fibroplasia; TFVF: tecido fibrovascular frouxo; TFVD: tecido fibrovascular denso; NV: neovascularização (média de vasos presentes). Escores: 0=ausente; 1= discreto; 2=moderado; 3= acentuado. Números seguidos por letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

Discussão

Devido ao expressivo crescimento mundial no número de diabéticos, é esperado o desenvolvimento de condutas que visem à melhoria na qualidade de vidas destes pacientes, seja por meio de ações que proporcionem o controle glicêmico, quanto pelo manejo das consequências produzidas pela hiperglicemia. Sabe-se que quando presente, o DM acarreta a manifestação de sinais clínicos sugestivos^{26,27}. Nos animais deste experimento, após a indução do DM, observou-se poliúria, polidipsia, polifagia seguidas pelo emagrecimento progressivo. Achados semelhantes foram relatados por Dias et al.²⁸.

Para a correta indução do diabetes e não perda de unidades experimentais, foi adotado como fármaco de eleição a aloxana. Esta escolha se baseou em estudos prévios com bons

resultados^{28,29}. Entretanto, verificou-se um óbito durante o procedimento anestésico e um caso de resistência à indução diabética. Nestas duas situações, não foi possível a substituição das unidades experimentais pertencentes ao grupo spray do subgrupo no terceiro dia.

A aloxana é um agente citotóxico específico às células beta, que culmina em insuficiência insulínica primária com conseqüente condição diabética permanente. Dentre as suas vantagens, estão a fácil manipulação e ação restrita ao pâncreas endócrino. No entanto, seus principais inconvenientes são a possibilidade de ocasionar o óbito e a influência de fatores na sua ação e na sensibilidade no hospedeiro. Aspectos como peso do animal, tempo de jejum, via de administração, administração de substâncias antagonistas e dieta podem exercer influência sobre a aloxana e resultar no não estabelecimento da hiperglicemia perdurável²⁹. Citação de resistência e reversão é situada na literatura²⁸.

Com base nas avaliações macroscópicas das feridas, notou-se a superioridade dos tratamentos à base de quitosana sobre o uso de solução fisiológica ao 14º dia pós-operatório, uma vez que tais opções terapêuticas proporcionaram às feridas do GG e GS uma taxa de contração de 100% e 99%, respectivamente, enquanto que no GC esta foi de 94%. Na análise do gráfico representativo da redução das áreas da ferida em função do tempo, nota-se que a quitosana teve maior efetividade nos quatro primeiros dias pós-operatório. Achados equivalentes foram anteriormente relatados^{21,22,24,28,30}. Descrições favoráveis também ocorreram com o uso do spray em queimaduras e na cicatrização por segunda intenção de feridas extensas em equídeos^{31,32}. Conforme Jakumar et al.¹⁷, o hidrogel de quitosana tem a capacidade de otimizar a contração e cicatrização da ferida por atuar como um curativo oclusivo que possibilita a permeabilidade de exsudatos. Nessa pesquisa, a taxa de contração foi adotada por representar um importante marcador de acompanhamento e avaliação da restauração tecidual²¹.

Na avaliação microscópica, o parâmetro neovascularização permaneceu estatisticamente semelhante entre os três grupos, embora o GS e GG tenha apresentado maior quantidade de neovasos. A ausência de resultados expressivos se deve, provavelmente, às alterações micro e macrovasculares e angiogênicas, inerentes ao DM^{8,13,28}.

Nas feridas do terceiro dia pós-operatório, constatou-se em todos os grupos uma fase inflamatória caracterizada pela presença intensa de células polimorfonucleares. Esta primeira etapa da cicatrização se inicia imediatamente após a lesão e é constituída, principalmente, por respostas celulares formadas pelos leucócitos^{33,34}. As primeiras células inflamatórias e polimorfonucleares atraídas à ferida são os neutrófilos, que atuam na eliminação de microrganismos, células mortas e corpos estranhos nas primeiras 48 horas³⁵.

Diferindo do GC, o GG e GS apresentaram uma presença moderada de células mononucleares, demonstrando seu adiantamento no processo cicatricial. Os parâmetros fibroplasia e tecido fibrovascular frouxo se mantiveram discretos em todos os tratamentos. Em todos os animais, a epitelização permaneceu ausente. Resultado semelhante a estes, no terceiro dia, foi relatado por Gopal et. al.²¹ que observaram abundante infiltrado inflamatório e escassa existência de fibroblastos. Segundo estes autores, a quitosana tem uma característica pró-inflamatória, o que leva a entender a razão dessa intensa resposta inflamatória.

Na análise histológica do sétimo dia, nota-se a sobreposição da fase inflamatória com a fase proliferativa, uma vez que há importante quantidade de células polimorfonucleares e mononucleares atreladas à ocorrência de fibroplasia e tecido fibrovascular frouxo. Novamente, percebe-se que os tratamentos com o gel de quitosana a 2% e spray de quitosana propiciaram o avanço da reparação tecidual, pois é possível constatar intensa fibroplasia e vigorosa existência de tecido fibrovascular frouxo, ao contrário do GC. Neste tempo experimental, a reepitelização se mostrou parcial em todos grupos. A quitosana em diferentes preparações, testada em feridas excisionais e queimaduras, permitiu a formação de um tecido de granulação com infiltrados inflamatórios, tecido fibroso imaturo, neovasos e proliferação de fibroblastos no sétimo dia pós-operatório^{21,24,36}. Entende-se que este biopolímero, por meio da despolimerização gradativa, libera N-acetil- β -D-glucosamina, que estimula a proliferação de fibroblastos e a síntese de ácido hialurônico, além de contribuir na ordenação das fibras de colágeno. Ademais, evidencia-se o estímulo à produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α), que é um importante regulador da matriz extracelular, pois inibe a síntese de proteases, estimula a produção de seus inibidores e, reforça a fibroplasia e a deposição de colágeno. Portanto, de maneira direta e indireta, a quitosana otimiza a cicatrização e promove a formação de uma cicatriz esteticamente aceitável^{17,30,37}.

A reepitelização observada no sétimo dia pós-operatório se justifica pela profundidade das lesões. Para que ocorra este processo, é necessário haver um tecido de granulação³⁸.

Ao 14º dia pós-operatório, notou-se uma completa reepitelização e a inexistência de células mononucleares e de tecido fibrovascular frouxo em todos os tratamentos. Percebeu-se que o GG e GS tiveram um processo de cicatrização mais evoluído quando comparado ao GC, pois se observou fibroblastos fusiformes e fibrose. No entanto, de todos os tratamentos, o que melhor auxiliou neste evento de reparação foi o gel de quitosana a 2%, em razão da ocorrência de fibrose em todas as camadas da derme. Resultados que reforçam estas propriedades adjuvantes da quitosana foram encontrados por Gopalet. al.²¹ e Archana et al.²⁴ na cicatrização por segunda intenção de feridas excisionais.

Conclusão

A quitosana, na forma de gel ou spray, é capaz de otimizar o processo cicatricial por meio do recrutamento antecipado de células mononucleares na fase inicial da cicatrização, na indução acentuada de fibroplasia e tecido fibrovascular denso e fibrose. Podendo, portanto, ser uma opção terapêutica como também a base para o desenvolvimento de outras formulações que proporcionem a reparação de feridas agudas ou crônicas em pacientes normoglicêmicos e diabéticos.

Referências

1. Maquart FX, Monboisse JC. Extracellular matrix and wound healing. *Pathol Biol.* 2014;62(2):91–5.
2. Mutschler W. Physiologie und pathophysiologie der heilung von defektwunden. *Unfallchirurg.* 2012;115(9):767-73.
3. Young A, McNaught CE. The physiology of wound healing. *Surgery.* 2011;29(10):475-9.
4. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2011;19(3):441-53.
5. Nelson RW, Reusch CE. Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dogs and cats. *J Endocrinol.* 2014;222(3):1-9.
6. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;94(3):311-21.
7. Zhang C, Ponugoti B, Tian C, Xu F, Tarapore R, Batres A, Alsadun S, Lim J, Dong G, Graves DT. FOXO1 differentially regulates both normal and diabetic wound healing. *J Cell Biol.* 2015;209(2):289-303.
8. Association AD. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2010;33(Suppl 1):S62–9.
9. Li Q, Kao H, Matros E, Peng C, Murphy GF, Guo L. Pulsed radiofrequency energy accelerates wound healing in diabetic mice. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(6):2255-62.
10. 9. Minatel DG, Enwemeka CS, França SC, Frade MAC. Phototherapy (LEDs 660/890nm) in the treatment of leg ulcers in diabetic patients: case study. *An Bras Dermatol.* 2009;84(3):279-83.
11. Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Adv Ther.* 2014;31(8):817-36.
12. Desta T, Li J, Chino T, Graves D. Altered fibroblast proliferation and apoptosis in diabetic gingival wounds. *J Dent Res.* 2010;89(6):609–14.

13. Francis-Goforth KN, Harken AH, Saba JD. Normalization of diabetic wound healing. *Surgery*. 2010;147(3):446-9.
14. Goldberg SR, Diegelmann RF. Wound healing primer. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2012;24(2):165-78.
15. Kilík R, Lakyová L, Sabo J, Kruzliak P, Lačjaková K, Vasilenko T, Vidová M, Longauer F, Radoňák J. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and diabetic rats. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1-9.
16. Kumar PTS, Lakshmanan VK, Raj M, Biswas R, Hiroshi T, Nair SV, Jayakumar R. Evaluation of wound healing potential of beta-chitin hydrogel/nano zinc oxide composite bandage. *Pharm Res*. 2013;30(2):523-37.
17. Jayakumar R, Prabakaran M, Kumar PTS, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv*. 2011;29(3):322-37.
18. Campana-Filho SP, Brito D, Curti E, Abreu FR, Cardoso MB, Battisti MV, Sim PC, Goy RC, Signin R, Lavall RL. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. *Química Nova*. 2007;30(3):644-50.
19. 22. Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra DC, Lia Fook MV, Costa ACFM. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. 2007;2(3):27-34.
20. Mayol L, De Stefano D, Campani V, De Falco F, Ferrari E, Cencetti C, Matricardi P, Maiuri L, Carnuccio R, Gallo A, Maiuri MC, De Rosa G. Design and characterization of a chitosan physical gel promoting wound healing in mice. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(6):1483-93.
21. Gopal A, Kant V, Gopalakrishnan A, Tandan SK, Kumar D. Chitosan-based copper nanocomposite accelerates healing in excision wound model in rats. *Eur J Pharmacol*. 2014;731:8-19.
22. Tran NQ, Joung YK, Lih E, Park KD. In situ forming and rutin-releasing chitosan hydrogels as injectable dressings for dermal wound healing. *Biomacromolecules*. 2011;12(8):2872-80.
23. Wang T, Zhu XK, Xue XT, Wu DY. Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. *Carbohydr Polym*. 2012;88(1):75-83.
24. Archana D, Dutta J, Dutta PK. Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: characterization, in vitro and in vivo studies. *Int J Biol Macromol*. 2013;57:193-203.
25. Tan HB, Wang FY, Ding W, Zhang Y, Ding J, Cai DX, Yu KF, Yang J, Yang L, Xu YQ. Fabrication and evaluation of porous keratin/chitosan (KCS) scaffolds for effectively accelerating wound healing. *Biomed Environ Sci*. 2015;28(3):178-89.
26. Nelson WR, Couto, CG. *Medicina interna de pequenos animais*. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. 1468 p.
27. Cobas RA, Gomes MdB. Diabetes mellitus. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2010;9(Suplem 1):69-75.

28. Dias TA. Gel de quitosana a 2% na cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas. [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; Escola de Veterinária e Zootecnia. 2012.
29. Lercio MM, Spadella CT, Machado JLM, Schellini AS, Padovani CR. Experimental alloxan diabetes-induced: a model for clinical and laboratory studies in rats. *Acta Cir Bras.* 2003;18(2):132-42.
30. Mayol L, De Stefano D, Campani V, De Falco F, Ferrari E, Cencetti C, Matricardi P, Maiuri L, Carnuccio R, Gallo A, Maiuri MC, De Rosa G. Design and characterization of a chitosan physical gel promoting wound healing in mice. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25(6):1483-93.
31. Godeiro JRG, Montenegro R, Câmara ACL, Fagundes SD. Macroscopic cicatrization after enucleation due to a sarcoid in a donkey treated by a chitosan based wound spray. 6th Iberoamerican Chitin Symposium and 12th International Conference on Chitin and Chitosan; 2012; Fortaleza, Brazil. São Paulo: Instituto de Química de São Carlos; 2012.
32. Godeiro JRG, Montenegro R, Fagundes SD. Evaluation of the cicatrizing activity of a chitosan based spray for the treatment of burn wounds in a horse a case study. 6th Iberoamerican Chitin Symposium and 12th International Conference on Chitin and Chitosan; 2012; Fortaleza, Brazil. São Paulo: Instituto de Química de São Carlos; 2012.
33. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery.* 2008;26(2):31-7.
34. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin. Dermatol.* 2007;25(1):9-18.
35. Harper D, Young A, McNaught CE. The physiology of wound healing. *Surgery.* 2014;32(9):445-50.
36. Kirichenko AK, Bolshakov IN, Ali-Riza AE, Vlasov AA. Morphological study of burn wound healing with the use of collagen-chi. *Bull Exp Biol Med.* 2013 Mar;154(5):692-6.
37. Leonida MD, Banjade S, Vo T, Anderle G, Haas GJ, Philips N. Nanocomposite materials with antimicrobial activity based on chitosan. *International Journal of Nano and Biomaterials.* 2011;3(4):316-34.
38. Williams J, Moores A. Manual de feridas em cães e gatos. 2 ed. São Paulo: Roca; 2013. 276p.

CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de existir no mercado inúmeros itens destinados a auxiliar o processo cicatricial, estes ainda detêm algumas desvantagens, dentre elas o alto custo e a necessidade de trocas diárias. Neste contexto, a quitosana surge como um biopolímero bastante promissor, visto que apresenta características desejáveis para a composição de matérias destinadas à substituição temporária do tecido tegumentar. Pode-se elencar entre os principais atrativos deste biopolímero, a biocompatibilidade, a atoxicidade e, principalmente, o custo relativo baixo, uma vez que é oriunda de refugo pesqueiro.

Ainda que diferentes formulações à base de quitosana tenham sido testadas, pela primeira vez foi realizado um estudo para avaliar a compatibilidade do spray de quitosana com a cicatrização de diabéticos. Os resultados obtidos reafirmaram a capacidade deste biopolímero em otimizar este processo de reparação. De forma semelhante, o gel de quitosana a 2% mostrou-se uma alternativa válida e eficaz. Acredita-se que seu alto grau de desacetilação seja, também, responsável por este efeito benéfico.

A realização de novos estudos é imprescindível para o melhor entendimento das respostas obtidas com o uso de tais formulações, como também para o desenvolvimento de outros produtos confeccionados a partir do gel e *spray* de quitosana, e que tenham como finalidade a reparação de feridas em pacientes normoglicêmicos e diabéticos.

ANEXO A – Normas da Revista Ciência Animal Brasileira

DIRETRIZES PARA AUTORES

Os trabalhos podem ser redigidos em português ou inglês. Os nomes dos autores, bem como a filiação institucional de cada um dos mesmos, devem ser inseridos nos campos adequados a serem preenchidos durante a submissão e não devem aparecer no arquivo. Ciência Animal Brasileira sugere que o número máximo de autores por artigo seja 6 (seis). Artigos com número superior a 6 (seis) serão considerados exceções e avaliados pelo Conselho Editorial e, se necessário, solicitada a correção como condição para publicação. Sugere-se um número máximo de 20 páginas e as figuras, gráficos e tabelas devem ser colocados no corpo do texto onde forem citados. É importante ressaltar que pesquisas feitas com animais devem citar a aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da instituição onde o trabalho foi realizado. A falta dessa aprovação impede a publicação do artigo.

Atualmente a revista não solicita nenhum pagamento financeiro pela submissão ou publicação do artigo, mas se reserva o direito de alterar essa política em circunstâncias futuras, mediante aviso prévio a todos os usuários.

Os textos devem ser organizados da seguinte forma:

Para submissões em português:

Título em português: Fonte Times New Roman 14, caixa alta, centrado, negrito;

Resumo: Fonte Times New Roman 12, espaço 1, justificado, com um máximo de 200 palavras;

Palavras-chave: idem, e no máximo 5 palavras chave;

Título em inglês (obrigatório): Fonte Times New Roman 12, caixa alta, centrado;

Abstract (obrigatório): Fonte Times New Roman 12, espaço 1, justificado;

Keywords: idem

Introdução: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Material e Métodos: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Resultados: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Discussão: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5 (Os tópicos Resultados e Discussão podem ser apresentados juntos dependendo das especificidades da área);

Conclusões: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Agradecimentos: (opcional) Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Referências (e não bibliografia): Usar fonte Times New Roman 11, espaço 1 entre linhas e colocar espaço 6 pontos acima e abaixo do parágrafo. As referências devem ser numeradas na ordem em que aparecem no texto. A lista completa de referências, no final do artigo, devem estar de acordo com o estilo Vancouver (norma completa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>; norma resumida http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Para as submissões em língua inglesa, a tipografia e espaçamentos são os mesmos, na seguinte sequência:

Título em inglês (Title);

Abstract;

Keywords;

Título em português (obrigatório);

Resumo em português (obrigatório);

Palavras-chave;

Introduction;

Material and Methods;

Results and Discussion;

Conclusions;

Acknowledgments (opcional),

References

Artigos do tipo **Nota Científica, Relato de Caso e similares** não estão sendo aceitos para submissão. **Artigos de Revisão de Literatura** somente serão publicados quando solicitados por convite do Conselho Editorial.

As referências a partir de resumos simples ou expandidos e trabalhos completos em anais de eventos são, em muitas ocasiões, de difícil recuperação. Por essa razão, solicitamos que esse tipo de fonte não seja utilizado como referência.

Com relação às teses, dissertações e monografias, solicitamos que sejam utilizados apenas documentos dos últimos **três anos** e quando não houver o respectivo artigo científico publicado em periódico. Esse tipo de referência deve, obrigatoriamente, **apresentar o link** que remeta ao cadastro nacional de teses da CAPES e os bancos locais das universidades que publicam esses documentos no formato .pdf.

Solicita-se, também, priorizar referências de periódicos e não de livros-texto.

O editor científico pode solicitar mais informações em relação às referências no momento de editoração do artigo. Seu pronto atendimento agilizará a sua publicação. O processo de resgate fácil das informações é o ponto principal de uma referenciação bibliográfica, técnica ou eletrônica.

Exemplos de referências

Trabalho em Periódicos:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7282/#A32362>)

Kalavathy R, Abdullah N, Jalaludin S, Ho YW. Effects of Lactobacillus cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. British Poultry Science. 2003;44(1):139-144.

Trabalho em Periódicos Online:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7281/#A55587>)

Gueiros VA, Borges APB, Silva JCP, Duarte TS, Franco KL. Utilização do adesivo Metil-2-Cianoacrilato e fio de náilon na reparação de feridas cutâneas de cães e gatos [Utilization of the methyl-2-cyanoacrylate adhesive and the nylon suture in surgical skin wounds of dogs and cats]. Ciência Rural [Internet]. 2001 Apr [cited 2008 Oct 10];31(2):285-289. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782001000200015. Portuguese.

Livro Inteiro:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7271/#A34171>)

Reis JC. Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária. 1st ed. Olinda: Luci Artes Gráficas; 2003. 651p. Portuguese.

Capítulo de Livro:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7271/#A34915>)

Pascoe PJ. Cuidados pós-operatórios do paciente. In: Slatter D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 2nd ed. São Paulo: Manole; 1998. p. 287-299. Portuguese.

Legislação:

Os modelos aqui foram adaptados porque a normalização proposta no Estilo Vancouver não corresponde à realidade brasileira.

Brasil. Constituição 1988. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado; 1988. Portuguese.

Brasil. Ministério da Educação e Ministério da Saúde. Portaria interministerial no. 1000 de 15 de abril de 2004. Resolvem certificar como Hospital de Ensino das Instituições Hospitalares que servirem de campo para a prática de atividades curriculares na área da saúde, sejam Hospitais Gerais e, ou Especializados. Diário Oficial da União. 2004 Abr 16; Seção 1. Portuguese.

Programas de Computador:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7244/>)

SAS Institute. Statistical Analysis System: user guide [CD-ROM]. Version 8. Cary (NC): SAS Insitute Inc., 2002.

Websites:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/#A59404>)

Silva MET, Flemming S, Martinez JL, Thomazini PL. Rendimento de carcaça de búfalos (*bubalus bubalis* L.) confinados em terminação, com dietas contendo diferentes relações de volumoso e concentrado. 2 - Características Quantitativas [Internet]. Brasília: Associação Brasileira de Zootecnia; 2010 Oct 8 [cited 2013 Jun 27]. Available from: <http://www.abz.org.br/publicacoes-tecnicas/anais-zootec/artigos-cientificos/reproducao-melhoramento-animal/23861-Rendimento-carcaa-bfalos-bubalus-bubalis-confinados-terminao-com-dietas-contendo-diferentes-relaes-volumoso-concentrado---Caractersticas-Quantitativas.html>. Portuguese.

Solicita-se que o número DOI, ou o link correspondente, dos artigos assim identificados seja acrescentado ao final da referência.

Ribeiro Carina Teixeira, De Souza Diogo Benchimol, Medeiros Jr. Jorge Luiz, Costa Waldemar Silva, Pereira-Sampaio Marco Aurélio, Sampaio Francisco José Barcellos. Pneumoperitoneum induces morphological alterations in the rat testicle. *Acta Cir. Bras.* [periódico na Internet]. 2013 Jun [citado 2013 Jun 27]; 28(6): 419-422. Disponível em:<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502013000600003>.

Exemplo de citação

Reports of *L. similis* lesion are scarce in the literature. Histopathological studies with three *Loxosceles* species of clinical importance, *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. reclusa*, showed that the venom induces vasodilation, edema, inflammatory infiltrate (mainly neutrophilic), hemorrhage, cutaneous muscle necrosis, thrombosis and arteriolar walls degeneration(6, 13-15). It is necessary to elucidate whether the histological lesion induced by the *Loxosceles similis* venom is similar to that observed in other species of medical importance. Furthermore, it is important to determine the pathogenesis of the loxoscelic dermonecrotic lesion(...)

According to Zanetti et al.(17) and Nowatzki et al.(18) who studied the action of the *L. intermedia* venom in vitro on endothelial cells, it was observed that 18 hours after the venom action, cells showed plasmatic membrane convolutions and chromatin condensation.

13. Smith WC, Micks WD. The role of polimorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider (*Loxosceles reclusa*). *Lab Invest.* 1970;22:90-3.
14. Strain GM, Snider TG, Tedford BL, Cohn GH. Hyperbaric oxygen effects on brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation in rabbits. *Toxicon.* 1991;29(8):989-96.
15. Ospedal KZ, Appel MH, Neto JF, Mangili OC, Sanches Veiga S, Gremski W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. *Int J Exp Pathol.* 2002;83(6):287-94.
17. Zanetti VC, da Silveira RB, Dreyfuss JL, Haoach J, Mangili OC, Veiga SS, et al. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002;13(2):135-48.
18. Nowatzki J, de Sene RV, Paludo KS, Veiga SS, Oliver C, Jamur MC, et al. Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. *Toxicon.* 2010;56(4):535-43

(Fonte: Pereira NB, Kalapothakis E, Vasconcelos AC, Chatzaki M, Campos LP, Vieira FO et al . Histopathological characterization of experimentally induced cutaneous loxoscelism in rabbits inoculated with *Loxosceles similis* venom. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* [periódico na Internet]. 2012 [citado 2013 Nov 04]; 18(3): 277-286. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992012000300005&lng=pt. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992012000300005>)

CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista.
2. Os autores devem estar cientes de que são os responsáveis diretos por todo o conteúdo de seu artigo.
3. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapasse os 2MB). No arquivo da submissão, excluir apenas os nomes e identificação dos autores, todos os outros elementos (título em português e em inglês, resumo, palavras chave, abstract e key words) devem permanecer no

- arquivo. O preenchimento do cadastro inclui todos os autores envolvidos (máximo de 6 autores), selecionando o contato principal. Atentar para o item 6 destas normas.
4. Todos os endereços de URLs no texto (Ex.:<http://www.ibict.br>) estão ativos e prontos para clicar.
 5. O texto está em espaço 1,5 com linhas numeradas; usa uma fonte de 12-pontos Times New Roman; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final.
 6. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na seção Sobre a Revista.
 7. A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos). Os nomes de TODOS os autores, com sua respectiva identificação institucional, foi cadastrada nos metadados da submissão, usando a opção incluir autor.
 8. Nos casos de artigos que envolvam pesquisa com animais, é obrigatória a inserção da aprovação pelo Comitê de Ética da instituição de origem do trabalho. Caso a pesquisa tenha envolvido questionário aplicado a pessoas, será necessário a aprovação pelo Comitê de Ética Humano da instituição, também.
 9. Incluir em documentos suplementares a declaração de anuência com a assinatura de todos os autores do artigo, conforme explicado em notícia da página principal. Veja o modelo da declaração:

Modelo da carta

DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA

Os autores abaixo-assinados declaram, para fins de submissão à Revista Ciência Animal Brasileira, publicada pela Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, que o artigo "Título" é original, inédito e não foi submetido a outro periódico.

Os autores expressam sua anuência acerca da submissão, assim como da Política Editorial, das Diretrizes para Publicação e da Declaração de Direito Autoral, que se aplicarão em caso de aceite e posterior publicação do artigo. Ao lado de cada nome e assinatura, consta uma descrição breve de como o autor e participou da referida pesquisa.

Cidade, data.

Autores

Nome, descrição breve da participação, Assinatura.

Nome, descrição breve da participação, Assinatura.

Nome, descrição breve da participação, Assinatura.

Nome, descrição breve da participação, Assinatura.

Nome, descrição breve da participação, Assinatura.

Nome, descrição breve da participação, Assinatura.

DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTORAL

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

- a. Autores mantém os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a Licença Creative Commons Attribution que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria e publicação inicial nesta revista.
- b. Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.
- c. Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer ponto antes ou durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado (Veja O Efeito do Acesso Livre).

POLÍTICA DE PRIVACIDADE

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.