ANA FLÁVIA MARÇAL PESSOA

A ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA E TÓPICA DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES ACELERA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

ANA FLÁVIA MARÇAL PESSOA

A ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA E TÓPICA DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES ACELERA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS

Tese apresentada ao programa de Pós - Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Orientadora: Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Pessoa, Ana Flávia Marçal.
A administração sistêmica e tópica de vitaminas antioxidantes acelera a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos / Ana Flávia Marçal Pessoa. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Diabetes mellitus e cicatrização.

Versão do título para o inglês: Sistemic and topical administration of antioxidant vitamins improve cutaneous wound healing in diabetic mice.

1. Diabetes mellitus 2. Cicatrização 3. Inflamação 4. Estresse oxidativo 5. Antioxidantes 6. Nanotecnologia I. Santos, Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0144/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Flávia Marçal Pessoa.

Título da Tese: A administração sistêmica e tópica de vitaminas antioxidantes acelera a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **004** nas fls. **82** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Marinilce Fagundes dos Santos, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Emprego de nanotecnologia para aceleração da cicatrização de feridas crônicas em ratos diabéticos- aplicação de anti-oxidantes utilizando sistema lipossomal** do qual participou(aram) o(s) **Ana Flávia Marçal Pessoa, Maira Estanislau Soares de Almeida, Mariana Marin Monteiro e o pesquisador Marcelo Lazzaron Lamers,** está de acordo com os Principios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **09.04.2010,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 12 de abril de 2010.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA – ICB/USP

Ao meu filho e companheiro

Pedro.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha mãe Soleida e meu filho Pedro, por me acompanharem em meus sonhos e realizações; ao meu irmão Gustavo, pelo exemplo de bom homem; a minha cunhada Alciane, pelo carinho; ao meu pai Francisco; minha madrasta Madalena e irmã Nathalia. Meu eterno agradecimento!

À minha orientadora, Marinilce Fagundes dos Santos, pelo acolhimento e ensinamentos profissional, pessoal e espiritual. Meu eterno agradecimento!

Aos meus colegas de Carol,Carol Viviana, Cilene, Cibele, Douglas, Kelly, Maria Gabriela, Paula e Robson pela convivência e ensinamentos e, em especial, à Juliana (Jú) que me acompanhou na caracterização de nosso modelo experimental. Thanks!!!

As minhas amigas e companheiras de laboratório e de vida Maíra e Mariana, nunca é tarde para recomeçar. Meu esterno carinho!!!

Aos técnicos de laboratório Cruz Alberto (Júnior), Emilia Ribeiro (que se tornou uma grande amiga), Fernanda Barrence, Gabriela Malheiros, Gaspar, Gisela, Priscila Sayami por toda a disposição e carinho ao transmitirem seus conhecimentos para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Profº Doutor Marcelo Lamers pela ideia inicial do meu projeto.

Aos meus colaboradores e amigos Francenildo (Fran), Flávia e Hosana Rodrigues pela confiança em mim depositada para o desenvolvimento de seus projetos.

A Professora Doutora Silvia Stanisçuaski Guterres e seus alunos Cristina e Manoel, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela receptividade e caracterização das nanopartículas.

Ao Professor Doutor Niels Olsen e ao aluno de doutorado Vinicius, do Departamento de Imunologia –ICB/USP, que me auxiliaram na caracterização e analises das células imunes da derme.

Ao Professor Doutor Marcelo Muscará e a técnica Simone, do Departamento de Farmacologia – ICB/USP, que me auxiliaram nas analises da enzimas antioxidantes na pele.

Ao Professor Doutor Edson, do Departamento de Anatomia – ICB/USP, pela disposição e contribuição nas analises das fibras colágenas.

Aos Professores do Departamento de Biologia Celular: Dânia Emi Hamassaki, Fabio Siviero, Marilia Seelaender, Patricia Gama, Telma Zorn, e aos seus alunos e

funcionários por abrirem as portas de seus laboratórios para o desenvolvimento deste projeto.

Aos queridos Carolina e Rodrigo por estarem ao meu lado em minha qualificação.

Aos professores Doutores Marco Aurélio, Maria Inês e Niels pela imensa contribuição ao meu trabalho durante o processo de qualificação.

Aos funcionários do biotério do Departamento de Biologia Celular, Braz, Cláudio e Fernando, pelos cuidados com meus animais em todas as etapas do meu projeto.

Aos funcionários de todos os setores portaria, segurança, manutenção e limpeza do Instituto de Ciências Biomédicas I - ICB-I/USP pela disposição e cuidados durante esses anos de convívio.

A secretária Regina pelo auxílio nas etapas burocráticas junto à Pós-graduação.

Aos funcionários da Biblioteca, que contribuíram com a revisão textual.

Aos meus Preletores, amigos e colegas da escola de Aprendizes do Evangelho, da Casa Espírita Maria de Magdala por me ensinarem e confortarem em todos os momentos da minha jornada.

Aos meus amigos de "Sampa" Anna Claudia, Daniela, Elaine, Fernanda, Grace, Maíra, Riccardo, Vanessa pelo acolhimento e amizade na cidade de Pedra.

Aos meus amigos do "Rio" Fernanda e Cristiano, casal nota mil.

Ao Prof. Ricardo Linares, por seu de amor e dedicação ao remo e seus alunos de todas as idades.

Aos meus amigos de todas as partes do país e do mundo por me aconselhar e acompanhar mesmo que de longe.

À família Marçal, meu porto seguro, a melhor família do mundo.

A minha equipe de trabalho do Laboratório Dasa, do Hospital Metropolitano da Lapa.

Ao meu modelo experimental pelos resultados que me fazem sentir alegria e entusiasmo com a pesquisa.

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

TUDO *tem o seu tempo determinado, é há tempo para todo o propósito debaixo do céu.*

Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;

Tempo de chorar, e tempo de rir, tempo de prantear, e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.

ECLESIASTE 3:1-8

RESUMO

Pessoa AFM. A administração sistêmica e tópica de vitaminas antioxidantes acelera a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos**.** Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A cicatrização deficiente é uma complicação frequente do Diabetes Mellitus (DM), contribuindo para a formação de feridas crônicas, especialmente em membros inferiores. Estas feridas são de difícil resolução e provocam grande sofrimento aos pacientes, além de acarretar custos elevados ao sistema público de saúde. Muitas complicações de longo prazo do DM estão associadas ao estresse oxidativo promovido pela hiperglicemia crônica. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração sistêmica (por via oral) e tópica (utilizando nanopartículas lipídicas sólidas – NLSs) de vitaminas antioxidantes na cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos. O DM foi induzido com Aloxana. Após 30 dias, uma ferida dorsal foi realizada e os camundongos foram tratados com antioxidantes por via oral (vitaminas E + C, 40 e 100 mg/kg de peso corporal, respectivamente) ou topicamente (vitamina e 2,5% em NLS confeccionada com manteiga de cacau como excipiente). As vitaminas foram administradas diariamente. A ferida foi avaliada ao longo de 14 dias, por meio de diferentes parâmetros: período de fechamento, histologia, perfil de células inflamatórias (citometria de fluxo para marcadores MIG, CD 206, CD 11b e Ly6G), citocinas pró e anti - inflamatórias (ELISA para IL -1β, IL – 4, KC, IL -12p40 e TNF – α), atividade das enzimas antioxidantes catalase, glutationa redutase, glutationa peroxidase e superóxido dismutase, concentração de marcadores de estresse oxidativo (malondialdeído e hidroperóxido lipídico) e análise do colágeno fibrilar pela técnica Picrosirius. Os resultados mostraram um atraso na cicatrização das feridas em animais diabéticos (fechamento aos 18 dias vs. 14 dias para animais controle), menor intensidade da reação inflamatória na fase inicial da cicatrização (3º dia) e aumento do estresse oxidativo. Na fase tardia da cicatrização (14º dia) observou – se uma persistência da reação inflamatória, atraso na reepitelização e menor conteúdo de colágenos fibrilares em animais diabéticos. O tratamento com vitaminas antioxidante, tanto sistêmico quanto tópico, foi completamente efetivo na aceleração da cicatrização das feridas, especialmente em animais diabéticos, por meio da modulação do estresse oxidativo e da reação inflamatória. As NLSs confeccionadas com manteiga de cacau mostraram - se um excelente veículo para a administração tópica de vitamina E na pele, apresentando também efeitos positivos para a cicatrização mesmo sem a vitamina. Concluímos que o tratamento com vitaminas antioxidantes E e C favorece a cicatrização cutânea em diabéticos, mesmo quando administrado por poucos dias, não sendo contra - indicado para indivíduos normoglicêmicos.

Palavras-chave: Diabetes. Cicatrização. Inflamação. Estresse oxidativo. Antioxidantes. Nanotecnologia.

ABSTRACT

PESSOA AFM. Sistemic and topical administration of antioxidant vitamins improve cutaneous wound healing in diabetic mice. [PhD Thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Deficient cutaneous wound healing is a common complication of diabetes mellitus (DM), contributing to the formation of chronic wounds, especially in the lower limbs. These wounds are hard to heal, causing great suffering to patients and imposing high costs to the public health system. Mani long – term complications of DM are associated with the oxidative stress caused by chronic hyperglycemia. The aim of this study was to evaluate the effects of systemic administration (oral) and topical (solid lipid nanoparticles – SLN) of antioxidant vitamins in skin wound healing in diabetic mice. DM was induced with Alloxan. After 30 days, a dorsal wound was performed and the mice were treated orally with antioxidants (vitamins E + C 40 and 100 mg/kg body weight, respectively) or topically (2.5% vitamin E within SLN using cocoa butter as excipient). Vitamins were administered daily. The wound was assessed over 14 days, using different parameters: closure, histology, inflammatory cells profile (flow cytometry for markers MIG, CD206, CD11b, Ly6G), pro and anti - inflammatory cytokines (ELISA for IL - 1β, IL – 4, KC, IL – 12p40 and TNF –α), activity of the antioxidant enzymes catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase, concentration of oxidative stress markers (malondialdehyde and lipid hydroperoxide) and analysis of fibrillar collagens by the Picrosirius technique. The results showed a delay in wound healing in diabetic animals (closing at 18 days vs. 14 days for control animals), less severe inflammatory reactions in the early healing (day 3) and increased oxidative stress. In the late phase of healing (day 14) there was a persistence of the inflammatory reactions, delayed reepithelization and lower content of fibrillar collagens in diabetic animals. Treatment with antioxidant vitamins, both systemic and topical, was completely effective in accelerating wound healing, especially in diabetic animals, by modulating the oxidative stress and inflammatory reactions. The SLNs made with cocoa butter proved to be an excellent vehicle for the topical administration of vitamin W to the skin, also providing positive effects on wound healing without the vitamin. We concluded that treatment with antioxidant vitamins E and C favors cutaneous wound healing in diabetics, even when administered for a few days, and is not harmful to normoglycemic individuals.

Keywords: Diabetes. Wound healing. Inflammation. Oxidative stress. Antioxidants. Nanotechnology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DVITE 2,5% - Diabético Nano VITE 2,5%

4-HNE - 4-hidróxi-2-nonenal

AGEs - Produtos da Glicação Avançada

AO - Antioxidantes

bar - unidade de pressão

BHT - Hidroxitolueno butilado

C + AO - Controle com Antioxidantes

CD11b - Grupo de Diferenciação 11b

CD206 - Grupo de Diferenciação 206

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CG - Controle Gel

CLAE - Cromatografia Liquida de Alta Eficiência

CLN - Carreador Lipídico Nanoestruturado

CNB - Controle Nano Branco

cp - centipoise

CVITE 1% - Controle Nanopartícula contendo Vitamina E 1%

CVITE 2,5% - Controle Nanopartícula contendo Vitamina E 2,5%

D + AO - Diabético com Antioxidantes

DG - Diabético Gel

DM - Diabetes Mellitus

DNB - Diabético Nanopartícula Branco

DO - Densidade Óptica

DP - Desvio Padrão

DVITE 1% - Diabético Nanopartícula contendo Vitamina E 1%

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

ERNs - Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FACS - Separação de Células Ativadas por Fluorescência

GLUT - Transportador de Glicose

GPx - Glutationa Peroxidase

GR - Glutationa Redutase

GSH - Glutationa na forma reduzida

GSSG - Glutationa Oxidada

H&E - Hematoxilina e Eosina

HDL - Lipoproteínas de Alta Densidade

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL-10 - Interleucina -10

IL-12p40 - Interleucina- 12p40

IL-1β - Interleucina - 1 beta

IL-4 - Interleucina - 4

IL-6 – Interleucina - 6

IL – 8 – Interleucina - 8

KC - Quimiotático para queratinócitos

LDL - Lipoproteínas de Baixa Densidade

LPO - Hidroperóxido Lipídico

Ly6G - Complexo antígeno linfocítico 6, locus G

Macrófago M 1 - Macrófago tipo 1

Macrófago M 2 - Macrófago tipo 2

MDA - Malondialdeído

MEC - Matriz Extracelular

MIG - Gene Induzido por Macrófago

MMPs - Metaloproteínases

mPa - megapascal

NB - Nanopartícula Branco

NFκB - Fator Nuclear kapa beta

NLSs - Nanopartículas Lipídicas Sólidas

nm - nanômetro

NTA - Nanopartícula

NT - Não tratado

Nano VITE - Nanopartícula Vitamina E

OMS - Organização Mundial de Saúde

PKC - Proteína Quinase C

PMFS - Fluoreto Fenilmetanossulfonilo

q.s.p - quantidade suficiente para

RDA - Recomendações Diárias Permitidas

SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL)

SL – Sem Lesão

SOD - Superóxido Dismutase

Span - tamanho e distribuição do tamanho das partículas

SVCT1 - Co - transportador de Ascorbato de Sódio tipo 1

SVCT2 - Co - transportador de Ascorbato de Sódio tipo 2

TBARS - Substâncias Reativas com Ácido Tiobarbitúrico

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral alfa

Tris-HCl - Trizma/ Cloridrato de tris(hidroximetil) aminometano

Vitamina E - Alfa-tocoferol

Vitaminas C - Ácido ascórbico

XTT - 2,3-Bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Epiderme humana reconstruída e desenho esquemático das camadas celulares correspondentes.....24

Figura 2 - Esquema da derme e seus componentes.....26

Figura 3 - Esquema do processo de cicatrização prejudicada em feridas diabéticas.....29

Figura 4 - Modelo esquemático para a geração de EROs e ERNs, durante a fosforilação oxidativa na membrana e matriz mitocondrial.....30

Figura 5 - Os mecanismos pelos quais produção intracelular dos Precursores dos AGEs promovem danos à célula endotelial.....31

Figura 6 - Estrutura química do Acetato de Vitamina E......33

Figura 7 - Estrutura química do Ácido Ascórbico 35

Figura 8 - Tamanho relativo das nanopartículas comparadas a itens comuns.....37

Figura 9 - Três modelos de incorporação de medicamentos pelas NLSs.....40

Figura 10 - Conformação estrutural vitamina E hidrossolúvel......45

Figura 11 - Análise da estabilidade das vitaminas E e C em solução aquosa por espectrofotometria visível e ultravioleta (UV) ao longo de 24 horas.....55

Figura 12 - Análise do volume residual da solução contendo vitaminas antioxidantes (AO) ofertada aos camundongos.....56

Figura 13 - Análise morfométrica da ferida no 14º dia pós - lesão em animais não tratados ou que receberam diferentes concentrações de vitaminas antioxidantes (AO).....56

Figura 14 - Evolução da cicatrização em animais controles e diabéticos no 3º, 7º, 10º, 14º e 18º dias pós - lesão......58

Figura 15 - Processo de cicatrização mostrando as diferentes fases de fechamento nos 3º, 7º, 10º e 14º dias pós – lesão em animais controles e diabéticos com e sem tratamento com vitaminas antioxidantes (AO)......59

Figura 16 - Parâmetros da ferida no 3º dia pós - lesão em camundongos controle e diabéticos não tratados e tratados com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C.....62

Figura 17 - Citocinas inflamatórias (A) TNF - α, (B) IL - 1β, (C) IL - 12p40 e (D) IL -4 na derme sem lesão e no 3º dia pós - lesão em camundongos controle e diabéticos, não tratados e tratados com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C.....63

Figura 18 - Frequência de leucócitos $CD11b^+$, $Ly6G^+$, $MIG^+/CD206^-$ e $CD206^+/MIG^-$ na derme sem lesão e no 3º dia pós - lesão em camundongos controle e diabéticos, não tratados e tratados com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C.....66

Figura 19 - Atividade das enzimas antioxidantes Catalase (A - B), Superóxido Dismutase (SOD, C - D), Glutationa Redutase (GR, E - F) e Glutationa Peroxidase (GPx, G - H), na derme sem lesão e no 3º dia pós - lesão em camundongos controle e diabéticos, tratados ou não com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C.....69

Figura 20 - Hidroperóxido Lipídico (LPO) na derme sem lesão e no 3º dia pós -lesão, em animais controles e diabéticos, tratados ou não com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C.....70

Figura 21 - Parâmetros da ferida no 14º dia pós - lesão em camundongos controle e diabéticos não tratados e tratados com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de

vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C.....72

Figura 22 - Citocinas inflamatórias TNF - α (A), KC (B), IL - 1β (C), IL - 12p40 (D) e IL - 4 (E) na derme sem lesão e no 14º dia pós - lesão em camundongos controles e diabéticos, não tratados e tratados com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C.....74

Figura 23 - Citocinas inflamatórias TNF - α (A), KC (B), IL - 1β (C), IL - 12p40 (D) e IL - 4 (E) na epiderme sem lesão e no 14º dia pós - lesão em camundongos controle e diabéticos, não tratados e tratados com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C.....75

Figura 24 - Frequência de leucócitos $CD11b^+$, $Ly6G^+$, $MIG^+/CD206^-$ e $CD206^+/MIG^-$ na derme sem lesão e no 14º dia pós - lesão em camundongos controles e diabéticos, não tratados e tratados com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C.....78

Figura 25 - Atividade das enzimas antioxidantes Catalase (A - B), Superóxido Dismutase (SOD, C - D), Glutationa Redutase (GR, E - F) e Glutationa Peroxidase (GPx, G - H), na derme sem lesão e no 14º dia pós - lesão em camundongos controles e diabéticos, tratados ou não com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C.....81

Figura 26 - Hidroperóxido Lipídico (LPO) na derme sem lesão e no 14º dia pós-lesão, em animais controles e diabéticos, tratados ou não com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C.....82

Figura 27 - Representação gráfica da distribuição granulométrica das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) no dia do preparo (dia zero) e após 30 dias.....84

Figura 28 - Representação gráfica da distribuição de diâmetro das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) a temperatura de 25 ºC, no dia

do preparo (dia zero) e no 30º dia.....86

Figura 29 - Distribuição de tamanho da partícula em função do número de partículas das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs).....87

Figura 30 - Representação gráfica da distribuição do diâmetro das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) incorporadas ao gel, na temperatura de 25 ºC.....89

Figura 31 - Área da lesão no 14º dia pós - lesão em camundongos controles e diabéticos não tratados (NT) e tratados com Nano VITE 1% (VITE 1%) e Nano VITE 2,5% (VITE 2,5%).....91

Figura 32 - Micrografia da área da lesão no 14º dia pós - lesão em camundongos controles e diabéticos não tratados (NT) e tratados com Nano VITE 1% (VITE 1%) e Nano VITE 2,5% (NANO VITE 2,5%) 92

Figura 33 - Avaliação do grau de estresse oxidativo no 14º dia pós - lesão em camundongos controles e diabéticos não tratados (NT) e tratados com VITE 1% (VITE E 1%) e Nano VITE 2,5% (VITE 2,5%).....93

Figura 34 - Processo de cicatrização mostrando as diferentes fases de fechamento nos zero, 3º, 7º, 10º, 12º e 14º dias pós - lesão em camundongos controles e diabéticos não tratados (NT) e tratados com Gel (G).....96

Figura 35 - Processo de cicatrização mostrando as diferentes fases de fechamento nos zero, 3º, 7º, 10º, 12º e 14º dias pós - lesão em camundongos controles e diabéticos não tratados e tratados com o Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) Nano Branco (NB) 99

Figura 36 - Processo de cicatrização mostrando as diferentes fases de fechamento nos zero, 3º, 7º, 10º, 12º e 14º dias pós - lesão em camundongos controles e diabéticos não tratados e tratados com o Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) Nano VITE 2,5% (VITE 2,5%).....102

Figura 37 - Área da lesão no 3º em camundongos controles e diabéticos não tratados (NT) e tratados com Gel (G), Nano Branco (NB) e Nano VITE 2,5% (VITE 2,5%).....105

Figura 38 - Área da lesão no 12º dia em camundongos controles e diabéticos não tratados (NT) e tratados com Gel (G), Nano Branco (NB) e Nano VITE 2,5% (VITE 2,5%).....108

Figura 39 - Área da lesão no 14º dia em camundongos controles e diabéticos não tratados (NT) e tratados com Gel (G), Nano Branco (NB) e Nano VITE 2,5% (VITE 2,5%).....111

Figura 40 - Fibras colágenas na área da lesão no 12º dia em camundongos controles e diabéticos sem lesão (SL), não tratados (NT), tratados com Gel (G), Nano Branco (NB), Nano VITE 2,5% (VITE 2,5%).....114

Figura 41 - Avaliação do grau de estresse oxidativo na derme no 14º dia pós - lesão em camundongos controles e diabéticos não tratados e tratados com gel (G), nano branco (NB) e Nano VITE 2,5% (NANO VITE 2,5%).....115

Figura 42 - Citocinas inflamatórias IL - 1β, KC, TNF - α, IL - 12p40 e IL - 4 no 3º dia pós - lesão, na derme de camundongos controles e diabéticos não tratados e tratados com Nano Branco (NANO BRANCO) e Nano VITE 2,5% (NANO VITE 2,5%).....117

Figura 43 - Citocinas inflamatórias IL - 1β, KC, TNF - α, IL – 12p40 e IL - 4 no 12º dia pós - lesão, na derme de camundongos controles e diabéticos não tratados e tratados com Nano Branco (NANO BRANCO) e Nano VITE 2,5% (NANO VITE 2,5%)......119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das formulações para confecção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs).....51

Tabela 2 - Glicemia e peso corporal de animais não tratados e tratados com diferentes concentrações de vitaminas antioxidantes (AO).....57

Tabela 3 - Distribuição granulométrica das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs).....83

Tabela 4 - A distribuição de diâmetro das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs).....85

Tabela 5 - Valores das análises de pH, condutividade e viscosidade das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs).....88

Tabela 6 - Viscosidade das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) incorporadas ao gel, nas velocidades de 0,75 rpm e 3 rpm a 25 ºC.....89

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 24

1.1 Diabetes Mellitus 24

1.2 A Pele 24

1.3 Cicatrização de Feridas Cutâneas 27

1.4 Cicatrização de Feridas Cutâneas no DM 29

1.5 Estresse Oxidativo e Agentes Antioxidantes 31

1.6 Vitaminas E e C 33

1.7 Nanopartículas como Veículos Farmacológicos 38

2 OBJETIVOS 43

2.1 Objetivos específicos ..... **Erro! Indicador não definido.**

3 MATERIAIS E MÉTODOS 44

3.1 Materiais 44

3.2 Animais 44

3.3 Procedimentos Experimentais 45

3.3.1 Indução do Diabetes Mellitus (DM) 45

3.3.2 Confecção da ferida 45

3.3.3 Tratamento Sistêmico com Antioxidantes (Vitamina E e C) 46

3.3.4 Análise de Estabilidade dos Antioxidantes (Vitamina E e C) por 47

Espectrofotometria Visível e Ultravioleta 47

3.3.5 Cinética de fechamento das feridas 47

3.3.6 Fixação e processamento do tecido 48

3.3.7 Análises Morfológicas 48

3.3.8 Citocinas inflamatórias 48

3.3.9. Citometria de Fluxo para marcadores celulares 48

3.3.10 Quantificação de Hidroperóxido Lipidico (LPO) 49

3.3.11 Ensaios de atividade de enzimas do sistema antioxidante 50

3.3.11.1 Determinação da atividade da catalase 50

3.3.11.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) 50
3.3.11.3 Determinação da atividade de glutationa peroxidase (GPx).....50
3.3.11.4 Determinação da atividade de glutationa redutase (GR).....51
3.3.12 Avaliação do malondialdeído (MDA) 51
3.3.13.1 Caracterização das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs).....52
3.3.13.2 Caracterização Físico - Química da Formulação 53
***3.3.13.2.1 Difratometria de laser**.....53*
***3.3.13.2.2 Determinação de pH, condutividade e viscosidade dasNanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) e Géis**.....53*
3.3.13.2.3 Determinação do diâmetro médio das partículas e polidispersão das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) e Géis 54
3.3.13.2.4 Monitoramento das Nanopartículas Lipídicas (NLSs).....54
3.3.13.2.5 Teor do fármaco na formulação e eficiência de encapsulação.....54
3.3.13.2.6 Preparo do gel 55
3.3.14 Aplicação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) 55
3.3.15 Análise Estatística 55

4 RESULTADOS.....56

4.1 Parte I - Tratamento Sistêmico com Vitaminas Antioxidantes (AO) *56*
4.1.1 Estabilidade e parâmetros utilizados para a escolha da concentração das vitaminas para o tratamento 56
4.1.2 Efeitos do tratamento sistêmico com vitaminas antioxidantes sobre o fechamento das feridas 59
4.1.3 Efeitos do tratamento sistêmico com vitaminas antioxidantes sobre o processo cicatricial no 3º dia pós - lesão 61
4.1.4 Efeitos do tratamento sistêmico com vitaminas antioxidantes sobre o processo cicatricial no 14º dia pós-lesão 72

4.2 Parte II - Padronização Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) *84*
4.2.1 Desenvolvimento das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) 84
4.2.2 Resultados da Caracterização da Nanopartícula Lipídica no gel (G) 90

4.3 - Parte III: Aplicação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) *91*
4.3.1 Escolha da concentração de vitamina E.....91
4.3.1.1 Morfometria 91

4.3.1.2 Morfologia.....92
4.3.1.3 Estresse Oxidativo - TBARS 93
4.3.2 Efeitos dos Diferentes Veículos sobre o Fechamento da Área da Lesão.....94
4.3.2.1 Morfometria – Gel.....94
4.3.2.2 Morfometria – Nanopartícula Branco (NB) 98
4.3.2.3 Morfometria – Nanopartícula VITE 2,5% (VITE 2,5%).....101
4.3.3 Efeitos do tratamento tópico das NLSs nas diferentes fases do processo cicatricial.....104
4.3.4 Fibras colágenas 113
4.3.5 Estresse Oxidativo - MDA 116
4.3.6 Citocinas Tratamento Tópico.....117
4.3.6.1 Fase Inflamatória.....117
4.3.6.2 Fase Final da Cicatrização - Reparo.....119
5 DISCUSSÃO 121
6 CONCLUSÕES 131
REFERÊNCIAS.....132

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de desordens metabólicas caracterizado por hiperglicemia crônica, causado por uma deficiência na produção de insulina (diabetes tipo 1) e/ou por resistência tecidual à ação da insulina (diabetes tipo 2). O DM atualmente acomete cerca de 6,4% da população mundial adulta (aproximadamente 347 milhões de pessoas) (Danaei, 2011); há uma previsão de aumento para 7,7% da população (cerca de 438 milhões de pessoas) em 2020 (Foundation ID: Diabetes, 2006; Rafehi et al., 2011).

Mudanças no estilo de vida e alimentação ao longo das últimas décadas são fatores que contribuem para o aumento da prevalência do DM em adultos de diferentes faixas etárias, contribuindo para a infertilidade masculina (Mascarenhas et al, 2012), regulação epigenética (Mark, 2014) e muitas outras complicações, dentre elas a cicatrização deficiente (Danaei, 2011). A cicatrização cutânea deficiente contribui para a ocorrência de feridas crônicas, especialmente em membros inferiores, que acometem cerca de 15% dos pacientes (Yach et al., 2006). O processo de cicatrização cutânea pode durar 10 x mais num indivíduo diabético quando comparado a um normoglicêmico, reduzindo a qualidade de vida dos pacientes e aumentando os gastos do sistema público de saúde. Outras complicações do DM que contribuem para as feridas crônicas são a neuropatia e o comprometimento da microvasculatura.

Apesar dos avanços na terapia com insulina (Penfornis et al., 2011) e no uso dos hipoglicemiantes orais, o controle adequado da glicemia ainda é um desafio em alguns pacientes, sendo muito comuns complicações que acometem o sistema vascular, rim, retina e nervos periféricos, (Brand-Williams, 1995, Maritim et al., 2003; Penfornis et al., 201; Tsilibary, 2003). Algumas destas complicações, a longo prazo, podem ser fatais.

1.2 A Pele

A pele é o maior órgão do organismo (pode recobrir uma superfície de cerca de 2 m^2), correspondendo a 16% do peso corpóreo. Seus tecidos constituintes são a

epiderme (epitélio pavimentoso estratificado corneificado) e a derme (tecido conjuntivo propriamente dito). Abaixo da derme encontra-se o tecido subcutâneo, constituído principalmente por tecido adiposo unilocular. Na pele delgada são encontrados anexos como pelos, glândulas sebáceas e sudoríparas; na pele espessa (superfícies palmares das mãos e planta dos pés) são encontradas glândulas sudoríparas. A pele é ricamente vascularizada e inervada (Lai-Cheong, McGrath, 2013; Venus, Waterman 2010).

A epiderme é constituída principalmente pelos queratinócitos, células epiteliais distribuídas em 5 estratos de espessura variável: *Camada Basal* ou Germinativa, responsável pela renovação das demais camadas, rica em células-tronco e residência dos melanócitos e células de Merkel (mecanorreceptores); *Camada Espinhosa,* na qual os queratinócitos unem-se entre si por desmossomos, rica em células de dendríticas de Langerhans e linfócitos T, ambos tipos celulares transientes; *Camada Granulosa,* com função de barreira (secreção de material lipossolúvel); *Camada Lúcida*, transição para a camada córnea evidente apenas na pele espessa; *Camada Córnea,* mais externa, constituída por queratinócitos mortos que perderam seu núcleo e preservam a queratina condensada (Figura 1) (Venus, Waterman 2010). As células migram e se diferenciam da camada basal até a camada córnea num período aproximado de 28 dias (Baroni, 2012; Lai-Cheong, McGrath, 2013). A camada córnea possui uma mistura aproximadamente equimolar de ceramidas (45 - 50%), colesterol (25%), ácidos graxos livres (10 - 15%) e o restante de vários outros lipídeos, dos quais o mais relevante é o sulfato de colesterol (Madison, 2013)

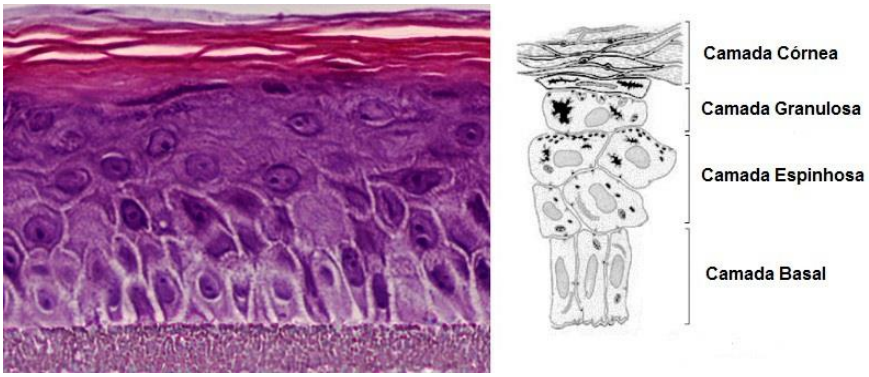


Figura 1 - Epiderme humana reconstruída e desenho esquemático das camadas celulares correspondentes. Modelo altamente diferenciado de epiderme humana, criocorte (8 µm, H & E coloração) após 14dias em cultura na interfase no ar-líquido (à esquerda). Desenho esquemático das correspondentes camadas celulares da epiderme humana, em comparação com a morfologia da pele humana reconstruída (direita). Fonte: http://reconstructed-human-epidermis.com

Entre as principais funções da pele estão a proteção contra desidratação, contra agentes invasores, raios solares e agressões mecânicas. A pele também é importante para a manutenção da homeostase corpórea e regulação da temperatura (Venus, Waterman 2010). Um de seus sistemas de defesa é constituído por proteínas que inibem o crescimento bacteriano, controlando a microbiota presente na epiderme (Baroni, 2012). A epiderme possui também ceramidas e diferentes lipídeos importantes para a sua integridade estrutural e funcional, que podem originar mediadores bioativos, como por exemplo alguns eicosanóides, endocanabinóides e esfingolipídios intimamente envolvidos na homeostasia da pele, inflamação e imunidade (Kendall, Nicolaou, 2013). Queratinócitos também secretam diferentes citocinas pro - inflamatórias (Lai - Cheong, McGrath, 2013; Venus, Waterman 2010), além de expressar proteínas do inflamassoma (Feldmeyer et al., 2010).

A derme é uma camada resiliente, que além de suportar forças mecânicas, sustenta e nutre a epiderme. Nela reside uma grande variedade de células-tronco, inclusive células - tronco epiteliais presentes nos folículos pilosos (Chen et al., 2014; Toma et al., 2005;) e são encontrados os diferentes anexos (Venus, Waterman 2010). A derme é dividida em *derme papilar*, com 300 - 400 µm de espessura, que se situa logo abaixo da camada basal da epiderme, e *derme reticular*, camada mais profunda que vai até o tecido subcutâneo, mais fibrosa e menos celular que a derme papilar (Sorrell, Caplan, 2004).

Como tecido conjuntivo, a derme contém células residentes como os fibroblastos (responsáveis pela síntese e degradação da matriz extracelular - MEC), células endoteliais, macrófagos e mastócitos. Contém também células transientes como linfócitos e outras células de defesa imunológica. A MEC é constituída por feixes de fibras colágenas e fibras elásticas, uma grande variedade de glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos com alto poder higroscópico que auxiliam na função de resistência à tração, resiliência e elasticidade da pele (Lai - Cheong, McGrath, 2013; Venus, Waterman 2010).

A principal célula da derme é o fibroblasto, que sintetiza e degrada colágenos fibrilares, principalmente do tipo I (75%) e do tipo III (15%), elastina e outros componentes da MEC. O colágeno representa 75% do peso seco e até 30% do volume da derme (Lai - Cheong, McGrath, 2013; Venus, Waterman 2010). Os vasos sanguíneos nutrem a pele, enquanto receptores sensoriais como Corpúsculos de

Paccini e Meissner são responsáveis pelas sensações táteis e de pressão. (Venus, Waterman 2010).

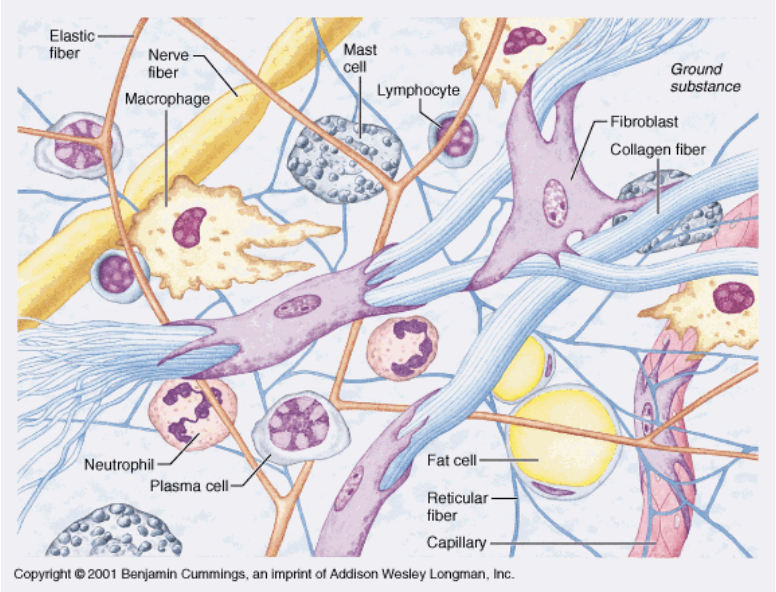


Figura 2 - Esquema da derme e seus componentes. Esquema apresentando as diversas células da derme como neutrófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, fibroblastos e estruturas capilares, fibras colágenas.
Fonte: http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat/images/Image116.gif

O tecido subcutâneo é um tecido conjuntivo frouxo com muitos adipócitos, unido à derme e aos órgãos subjacentes. É responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apoia. Em indivíduos não obesos, cerca de 80% da gordura corpórea está no tecido subcutâneo (Lai - Cheong, McGrath, 2013; Venus, Waterman 2010).

1.3 Cicatrização de Feridas Cutâneas

O processo de cicatrização visa a recuperação da homeostase da pele e apresenta uma evolução natural em fases, desde que não existam fatores que contribuam para que o processo se torne crônico.

A cicatrização pode ser de primeira ou de segunda intenção, dependendo da proximidade dos bordos da ferida entre si. Na cicatrização por primeira intenção as bordas estão próximas (por exemplo, em processos cirúrgicos de pequeno porte que recebem sutura) e há uma menor perda de tecidos. Na cicatrização por segunda intenção há perda extensa de tecido (por exemplo, em queimaduras e cirurgias de

grande porte). O tempo de recuperação é peculiar a cada tipo de cicatrização (Beldon, 2010; Enoch, Leaper, 2005).

Em condições normais, a cicatrização pode ser dividida em três fases que se sobrepõem. A primeira fase é denominada *inflamatória,* caracterizada pela hemostasia, formação do coágulo e recrutamento de células inflamatórias principalmente, neutrófilos e macrófagos (Beldon, 2010; Enoch, Leaper, 2005). A presença de um maciço infiltrado inflamatório com células fagocitárias propicia a produção de proteases que degradam os restos celulares e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Beldon, 2010; Gurtner et al., 2008; Lowry, 1993), assim como a produção de fatores quimiotáticos e citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo IL - 6, IL - 1β e o Fator de Necrose Tumoral - α (TNF - α). Estas citocinas atuam como mediadores da ativação do fator de transcrição NFκB e da produção de mais EROs durante o processo inflamatório, que retroalimentam positivamente a reação inflamatória (Beldon, 2010; Enoch, Leaper, 2005; Gurtner et al., 2008; Lowry, 1993). Fibroblastos e queratinócitos também participam nesta fase produzindo citocinas, fatores quimiotáticos e fatores de crescimento (Enoch, Leaper, 2005; Gurtner et al., 2008; Lowry, 1993).

A segunda fase denomina-se de *formação do tecido de granulação*, iniciando-se no 3º dia e terminando aproximadamente no 5ª dia pós - lesão, quando a quantidade de células inflamatórias, níveis de citocinas pró - inflamatórias e EROS decaem (Enoch, Leaper, 2005; Beldon, 2010). Nessa fase observa-se proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais para a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), síntese de diferentes fatores de crescimento, síntese de MEC, ativação de metaloproteinases de MEC (MMPs), proliferação e diferenciação de fibroblastos e sua diferenciação em miofibroblastos, células contráteis que auxiliam na contração da ferida. Os queratinócitos migram da borda para o centro da lesão (reepitelização), em grande parte estimulados por fatores de crescimento secretados pelos fibroblastos (Beldon, 2010; Enoch, Leaper, 2005; Gurtner et al, 2008; Martin,1997 ; Park e Lim, 2011; Schäfer, Werner, 2007).

A terceira e última fase denomina-se *de remodelação* pode durar várias semanas. Nesta fase ocorre diminuição da atividade das MMPs, apoptose de queratinócitos e células endoteliais, substituição de grande quantidade de colágeno do tipo III por colágeno do tipo I, redução do número de fibroblastos e macrófagos e reepitelização (Beldon, 2010; Enoch, Leaper, 2005; Gurtner et al, 2008; Martin,1997;

Park e Lim, 2011; Schäfer, Werner, 2007). A área da lesão torna-se mais resistente às tensões, apesar de não recuperar totalmente suas características iniciais, já que os apêndices da pele (folículos pilosos e glândulas) ainda estão ausentes (Beldon, 2010; Enoch, Leaper, 2005; Gurtner et al, 2008; Martin,1997 ; Park e Lim, 2011; Schäfer, Werner, 2007).

1.4 Cicatrização de Feridas Cutâneas no DM

As úlceras nos membros inferiores de pacientes diabéticos reduzem enormemente a qualidade de vida dos indivíduos e geram forte impacto econômico aos órgãos de saúde (Wounds International, 2013). Parte deste problema deve-se à cicatrização deficiente, que tem como fatores contribuintes um aumento na geração de EROs (superando a capacidade antioxidante tecidual e gerando o estresse oxidativo) e também de Espécies Reativas do Nitrogênio (ERNs). O consequente dano tecidual agrava o processo inflamatório, resultando em uma ferida crônica de difícil cicatrização (Wounds International, 2013; Menke, 2008).

Na ferida ou ulcera diabética não observamos uma distinção clara das fases do processo de cicatrização, como observado no processo de cicatrização de um indivíduo saudável. No DM todas as fases da cicatrização estão afetadas (Blakytny, Jude, 2006; Menke, 2008; Ochoa et al.,2007; Rosenberg, 1990).

A fase *inflamatória* inicia-se de forma lenta, com um menor número de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, o que reduz a atividade bactericida (Cavanagh, 2005; Komesu et al, 2004; Menke, 2008); na epiderme o número de células de Langerhans está reduzido (Strom et al., 2014). A geração aumentada de EROs resulta na produção persistente de citocinas e fatores quimiotáticos, contribuindo para o recrutamento das células inflamatórias adicionais para o local da lesão (Blakytny, Jude, 2006; Menke, 2008; Ochoa et al.,2007; Rosenberg, 1990).

Na fase de formação do *tecido de granulação* observa-se a persistência das células inflamatórias e de elevados níveis das citocinas pró-inflamatórias IL1 - β, TNF - α, IL - 6 e de mediadores inflamatórios como o COX - 2 e iNOS (Wetzler, 2000), além das EROs (Pérez - Matute et al., 2009). Citocinas anti - inflamatórias como a IL - 10 (Mirza, Koh, 2011), fatores de crescimento e angiogênese (Ceriello et al., 2007; Martin et al., 2003), estão diminuídos. Há também aumento de atividade

das MMPs e redução dos seus inibidores, diminuição na síntese de colágeno (Spanheimer et al., 1988), deficiência na migração de fibroblastos e atraso na reepitelização (Cavanagh, 2005; Menke, 2008; Ocha et al., 2007; Zhu et al.,2010).

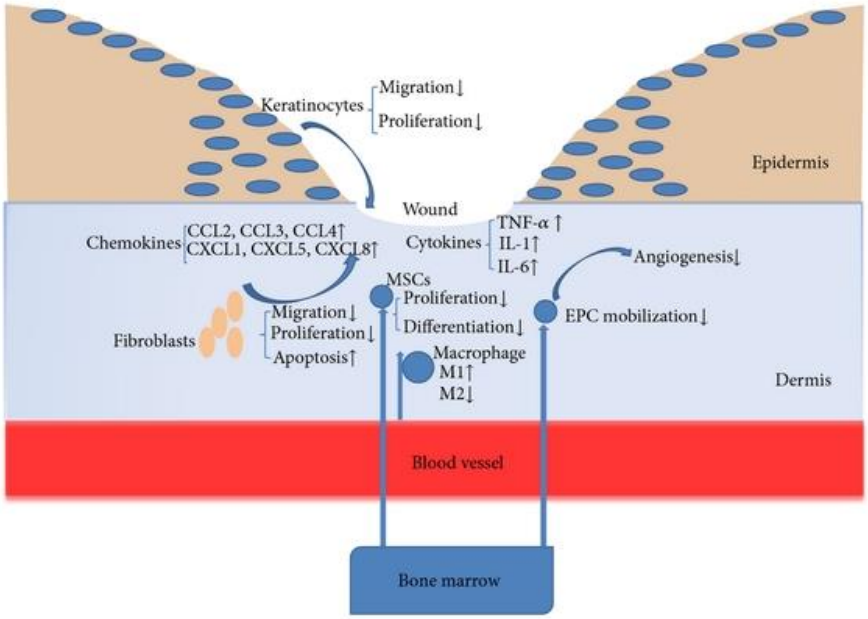


Figura 3 - Esquema do processo de cicatrização prejudicada em feridas diabéticas. No diabetes, as citocinas inflamatórias e quimiocinas estão aumentadas, tais como o TNF - α, IL - 1, IL - 6, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL5, e CXCL8. Os processos celulares afetados pela diabetes incluem migração anormal de queratinócitos e fibroblastos; proliferação e apoptose aumentados; polarização de macrófagos anormais (aumento de macrófagos pró - inflamatórios - M1, e diminuição macrófagos anti - inflamatórios - M2); recrutamento prejudicado de células-tronco mesenquimais (MSCs) e células progenitoras endoteliais (EPCs), e diminuição da vascularização. Fonte: Xu et al., 2013.

Na *fase de reparo*, ainda se observa a reduzida migração de queratinócitos, persistência de células inflamatórias, com elevados níveis das citocinas inflamatórias, elevada atividade de MMPS (por exemplo MMP - 9), grande quantidade de EROs e redução da atividade de enzimas antioxidantes como a glutationa, catalase, superóxido dismutase (SOD), e também de agentes antioxidantes como vitaminas E e C (Cavanagh, 2005; Cole et al., 2001; Menke, 2008; Ocha et al., 2007; Péres Matute et al., 2009; Rosenberg, 1990; Shukla et al., 1997). Consequentemente, há aumento de produtos da peroxidação lipídica como o malondialdeído (MDA) e 4 - hidroxi- 2 – nonenal (4-HNE).

1.5 Estresse Oxidativo e Agentes Antioxidantes

A geração de EROs na pele e outros tecidos é consequência natural do metabolismo celular, como por exemplo os EROs gerados pela cadeia respiratória na mitocôndria (Wagener et al., 2013). O DM está entre as doenças crônicas que aumentam a produção das EROs pela oxidação aumentada da glicose; estes podem contribuir para modificações não especificas em proteínas, lipídeos de membranas (peroxidação lipídica) e ácidos nucléicos, resultando em danos biológicos variados (Péres-Matute et al., 2009; Scott, King, 2004). A produção aumentada de EROs e ERNs no DM desempenha, portanto, um papel importante na patogênese das complicações crônicas dessa doença (Evans et al., 2002; Péres Matute et al., 2009), principalmente por agravar o processo inflamatório (Wagener et al., 2013).

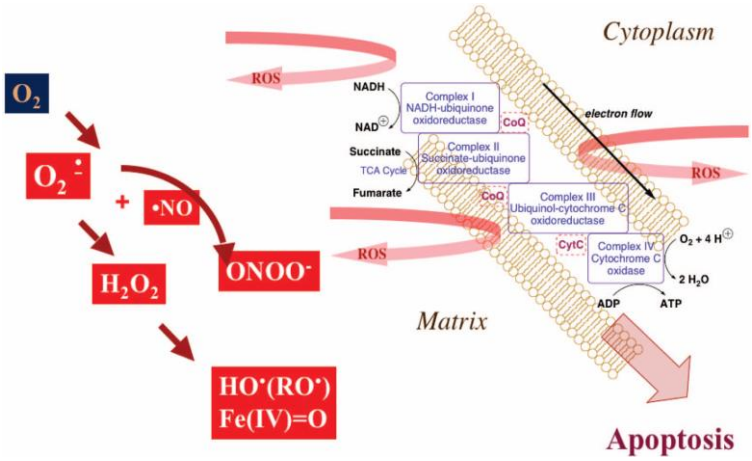


Figura 4 - Modelo esquemático para a geração de EROs e ERNs, durante a fosforilação oxidativa na membrana e matriz mitocondrial. A formação do anion superóxido inicia um processo de cascata que pode induzir a morte celular programada (apoptose). Fonte: Hoye et al., 2008.

O estresse oxidativo é definido como a geração em excesso e/ou uma deficiência na remoção das EROs (íons superóxido, hidroxila, peróxidos e hidroperóxidos, por exemplo) e ERNs pelos sistemas antioxidantes intracelulares; ocorre na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou no reticulo endoplasmático (Johansen et al., 2005; Maritim et al., 2003). Antioxidantes são substâncias que retardam ou impedem a oxidação do substrato (Halliwell, Gutteridge, 1999). O desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e as espécies moleculares reativas (EROs e ERNs) geradas em condições patológicas resulta em alterações nas estruturas celulares como a peroxidação lipídica nos lipídios formadores das membranas celulares,

glicação de proteínas e danos ao DNA, levando à apoptose celular (Halliwell, Gutteridge, 1999; Maritim et al, 2003; Péres Matute et al., 2009).

As EROs, além de atuar de forma direta sobre diferentes moléculas,, também ativam vias metabólicas alternativas que contribuem ainda mais para os danos celulares aumentando a geração de EROs ou depletando defesas antioxidantes intracelulares (Maritim et al, 2003). Um exemplo é a via da PKC, que ativa genes pró - inflamátorios e a geração de íons superóxido; outro exemplo é a ,geração de AGEs, que aumentam a geração de EROs (Brownlee, 2001; Inoguchi, *et al*. 2000; Wagener et al., 2013). A via dos polióis, na qual a glicose é convertida em sorbitol, pode aumentar a atividade da NADPH oxidase e da PKC (Brownlee, 2001; Greenhalgh, 2003; Martin et al., 2003; Péres Matute et al., 2009; Scott, King, 2004). As vias das hexosaminas e dos AGEs atuam sobre a degradação de colágeno, ativação de NFκB e consequentemente da produção de citocinas inflamatórias (IL - 6, TNF - α e IL - 1β) (Huebschmann et al., 2006), promovendo a persistência de células inflamatórias e a geração de mais EROs (Brownlee, 2001; Greenhalgh, 2003; Martin et al., 2003; Péres Matute et al., 2009; Scott, King, 2004).

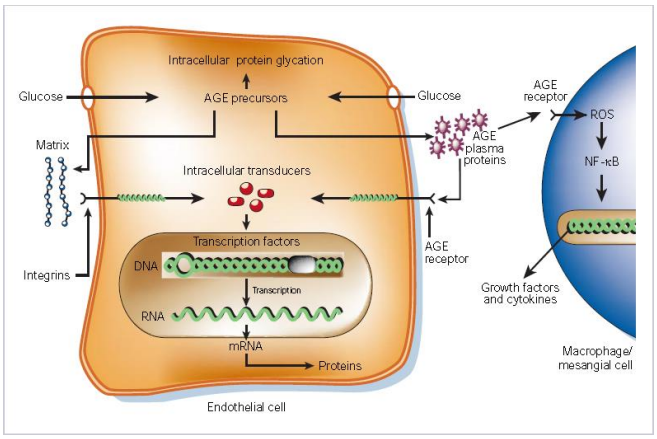


Figura 5 - Os mecanismos pelos quais produção intracelular dos Precursores dos AGEs promovem danos à célula endotelial. Proteínas da matriz extracelular modificadas, pelas AGEs, interagem com outras proteínas da matriz extracelular e com integrinas. Modificações das proteínas do plasma por precursores de AGE criam ligantes que se ligam aos receptores da AGE, induzindo alterações na expressão de genes em células endoteliais, mesangiais e macrófagos. Fonte: Brownlee, 2001 (Revisão).

Devido ao fato do estresse oxidativo desempenhar um papel preponderante em eventos celulares fundamentais para uma cicatrização eficiente, estudos *in vivo* vêm sendo realizados utilizando antioxidantes em modelos experimentais de DM. O grau de estresse oxidativo pode ser indiretamente estimado por meio de diferentes

biomarcadores: enzimáticos (enzimas amplamente distribuídas na pele - catalase, SOD, glutationa redutase – GSH - redutase, glutationa peroxidase – GSH - Px, perorodoxina - Prdx, MDA, 4 - HNE e F2 - isoprostanóides, que são produtos da peroxidação lipídica (Johansen et al., 2005; Niki, 2009; Wagener et al., 2013). No DM alguns biomarcadores não enzimáticos como as vitaminas antioxidantes E e C estão diminuídas (Ceriello et al., 2007; Greenhalgh, 2003; Shaw, Martin, 2009; Scott, King, 2004).

Substâncias antioxidantes como as vitaminas C e E, ácido lipóico e N-acetilcisteína, dentre outros, preveniram os efeitos deletérios da hiperglicemia sobre a síntese da MEC, produção de citocinas e crescimento celular (Scott, King, 2004). Um estudo utilizando tratamento com vitaminas C e E combinadas, administradas por via oral, apresentou notável efeito foto-protetor, quando comparado ao uso individual destas vitaminas. O uso tópico de vitamina C (em creme), no entanto, demonstrou baixa estabilidade da mesma na presença de oxigênio (Wagener et al., 2013). É importante ressaltar que os efeitos da suplementação com antioxidantes à longo prazo precisam ser avaliados, uma vez que um estudo recente demonstrou aumento da mortalidade em mulheres (Mursu et al., 2011).

1.6 Vitaminas E e C

A vitamina E foi descoberta em 1922 por Evans e Bishop; presente principalmente nos óleos, sementes, milho, soja, vegetais, margarina, nozes, folhas verdes, gema de ovo, alguns tipos de carnes e produtos lácteos (Bjorneboe et al.,1989; NRC,1989). É um antioxidante lipofílico, formado por um grupo de 8 moléculas lipídicas isoméricas, caracterizadas por uma estrutura de anel 6 - cromano polar e uma cadeia lateral prenil hidrofóbica, que é responsável pela solubilidade da vitamina. Esses isômeros lipídicos se dividem em 2 grupos, o grupo dos tocoferóis e tocotrienóis, ambos subdivididos nas frações saturadas α-, β-, γ- e δ (Figura 6) (Azzi, Stocker, 2000; Bjorneboe et al.,1989; Berdnikovs et al., 2009; NRC,1989; Sen et al., 2006; Uchida et al., 2011).

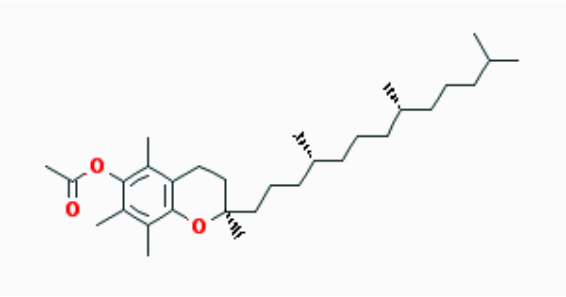


Figura 6 - Estrutura química do Acetato de Vitamina E.
Fonte: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=86472&loc=ec_rcs

Essa estrutura propicia aos tocoferóis agirem como antioxidantes lipídicos, pois é capaz de doar um hidrogênio do grupo hidroxila (presente no anel) aos radicais lipídicos produzidos na cadeia de reações da peroxidação lipídica, dando origem ao radical tocoferil. Este pode voltar a se tornar α - tocoferol pela ação redutora do ácido ascórbico ou glutationa, dentre outros (Azzi, Stocker, 2000; Kamal-Eldin, Appelqvist, 1996).

Acredita-se que a função primária da vitamina E é prevenir o início da peroxidação lipídica, evitando o dano ao tecido por capturar o oxigênio *singlete* e outros radicais livres capazes de alterar a estrutura da membrana (Chow, 1991). A fração alfa (α) do tocoferol tem como principal função ser antioxidante, com efeitos anti - inflamatório e imunoestimulante (Keller, Fenske, 1998; Tahan et al., 2011). Além disso, modula vias de sinalização celular, a expressão de proteínas (Chow, 1991; Keller, Fenske, 1998; Traber, Stevens, 2011; Wang, Quinn, 1999), a geração de prostaglandinas e outros produtos da peroxidação (Chow, 1991).

Devido à sua característica lipofílica, a vitamina E é armazenada preferencialmente nas membranas das células, protegendo as organelas e membrana celulares contra agentes oxidantes internos ou externos.

O α-tocoferol é a forma mais abundante da vitamina E em humanos por possuir melhor atividade biológica. Sua configuração na forma natural ocorre como RRR, enquanto na forma sintética o α-tocoferol é formado por uma mistura racêmica dos 8 tipos de esteroisômeros que formam a vitamina E, conhecida como *all – rac* – α - tocoferol (Azzi, Stocker, 2011; Clifford et al., 2005; Hacquebard, Carpentier, 2005).

O transporte da vitamina E pelo organismo ocorre primeiramente pelos quilomícrons até o fígado, sendo distribuída aos demais tecidos pelas lipoproteínas LDL e, em menor proporção, pelo HDL (Azzi,Sotcker, 2011; Bjorneboe et al.,1989; Brigelius-Flohe, Traber,1999; Hacquebard, Carpentier, 2005). A quantidade diária

máxima a ser ingerida de vitamina E varia de acordo com sua fonte, sendo de 800 mg/dia para a forma natural (RRR – α - tocoferol) e, 1230 mg/dia para a forma sintética (*all* – *rac* – α - tocoferol) (Brigelius-Flohe, Traber,1999). A quantidade preconizada é de cerca de 400 mg/dia (Keller, Fenske, 1998).

A deficiência de vitamina E no organismo é rara. Quando ocorre está relaciona a anormalidades genéticas na absorção da vitamina pelo fígado ou a síndromes de má absorção, resultando na diminuição da meia vida dos eritrócitos, anormalidades neuromusculares (Brigelius-Flohe, Traber, 1999; Uchida et al., 2011) e miopatias (Howard et al., 2011).

Vários estudos realizados sobre as concentrações plasmáticas e teciduais de vitamina E no diabetes apresentaram resultados controversos (Maritim et al., 2003). Em uma revisão de 2007, Fardoun demonstrou uma associação entre baixos níveis de vitamina E (e outros antioxidantes) e aumento da incidência de diabetes tipo 2. Interessantemente, Arnlov et al. (2009), em um estudo epidemiológico, demonstraram que pacientes que ingeriram vitamina E tiveram menor incidência de DM. Estudo utilizando ratos diabéticos (indução com estreptozotocina) mostrou que o tratamento com vitamina E melhorou os níveis de hemoglobina glicada (biomarcador para o diagnóstico de diabetes) e inibiu a formação de MDA (Pazdro, Burgess, 2010). O mecanismo pelo qual a vitamina E atua sobre as complicações diabéticas não está totalmente esclarecido. Acredita-se que atue sobre a atividade da enzima PKC, diminuindo os níveis de diacilglicerol (DAG) e, consequentemente, atenuando os efeitos já descritos anteriormente (McCary et al., 2011; Scott, King, 2004).

A vitamina C ou ácido ascórbico é uma lactona derivada da síntese de glicose. Sua forma ativa, hidrossolúvel, é o L - ácido ascórbico (Figura 7), que quando ionizado torna- se ascorbato (Linster, Schaftingen, 2007). A vitamina C está presente em vegetais como couve, brócolis, espinafre, tomate, batata e frutas cítricas. Pode ser sintetizada por muitos mamíferos, como os roedores, mas não pelos humanos, devido à perda da enzima L - gulonolactona oxidase, responsável pela síntese do ascorbato (Mandl et al., 2009; NRC,1989).

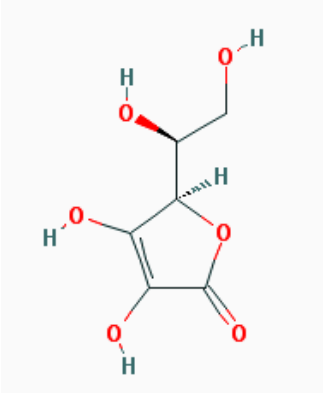


Figura 7- Estrutura química do Ácido Ascórbico.
Fonte: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=54670067&loc=ec_rcs#

A vitamina C atua como antioxidante através da remoção e destruição das EROs, mantendo os componentes sulfidrilas em estado reduzido (Chow, 1991; Lima et al., 2009; Naidu, 2003). Atua, por exemplo, na regeneração da vitamina E. Na presença de íons metálicos, no entanto, a vitamina C atua como uma substância pró - oxidante, podendo levar à geração das EROs (Duarte, Lunec, 2005) ou à glicação de proteínas (Birlouez-Aragon, Tessier, 2003; Mandal et al., 2009; Siese, Stahl, 1995; Traber, Stevens, 2011).

A vitamina C também atua como cofator de 8 enzimas envolvidas na hidroxilação da prolina e lisina para a síntese de colágeno (Barnes, 1975; Myllyharju, Kivirikko, 2004), na biossíntese da carnitina e norepinefrina (Siese, Stahl, 1995) e na síntese de ceramidas. E importante para funções como a proliferação de fibroblastos dérmicos, funções dos leucócitos e macrófagos, reações alérgicas e cicatrização de feridas (Duarte et al., 2009; Lima et al., 2009; NRC, 1989; Traber, Stevens, 2011).

A vitamina C é absorvida no intestino pelos transportadores dependentes de sódio SVCT1 and SVCT2 (Mandl et al., 2009; Rose, 1980). Por ser hidrossolúvel, a vitamina C está presente em compartimentos hidrofílicos celulares. Os queratinócitos são células com grande capacidade de armazenamento desse antioxidante (Catani et al, 2005), o que também ocorre em órgãos como o cérebro, fígado, pâncreas e rins (Padayatty, Levine , 2001).

A ingestão diária de vitamina C é de cerca de 100 mg (RDA, 1989), com uma absorção de até 80% deste valor. O consumo de 200 mg/dia está associado com uma diminuição do risco de câncer na cavidade oral, esôfago e cólon. A administração de doses elevadas (3 g/dia) é contra indicada para pacientes com problemas renais, pois pode resultar na formação de cristais de oxalato ou

hiperoxalúria; em condições normais, o excesso de vitamina C é excretado na forma de ascorbato (Levine et al.,1999; Mandl et al, 2009). Por outro lado, a deficiência na ingestão de vitamina C resulta no escorbuto, doença caracterizada pelo enfraquecimento das estruturas colágenas, que resulta em hemorragia capilar generalizada (Traber, Stevens, 2011; Sies, Stahl, 1995). Baixos níveis de vitamina C já foram observados no estresse, exercícios físicos extenuantes, infecções virais, tabagismo, pancreatite e em pacientes com DM dos tipos 1 e 2 (Hampl et al.,1988; Mandl et al., 2009; Naidu, 2003;).

No estresse oxidativo, uma forma transiente e instável da vitamina C é gerada o ácido dehidroascórbico (DHA), que é transportado para os tecidos pelos GLUTs 1, 3 e 4. No interior dos neutrófilos o DHA é novamente convertido a ácido ascórbico (Padayatty, Levine, 2001; Tsukaguchi et al., 1999). Os neutrófilos, quando expostos a condições de estresse, aumentam em até 10 vezes sua capacidade de armazenamento do ácido ascórbico, protegendo-se do dano oxidativo (Mandl et al., 2009).

O uso do ácido ascórbico acelerou a cicatrização e aumentou a neovascularização (Lima et al., 2009) e, quando associado a hipoglicemiantes, melhorou os níveis glicêmicos de pacientes diabéticos do tipo 2 (Dakhale et al., 2011). Uma ação anti - inflamatória da vitamina C foi observada na redução do infiltrado inflamatório presente na artrite reumatóide (Davis et al., 1990).

A associação das vitaminas E e C proporciona a ação do ascorbato sobre o radical tocoferil formado durante sua ação antioxidante e / ou por sofrer ação dos oxidantes. O ascorbato doa um átomo de hidrogênio para o radical tocoferil, reduzindo - o novamente a α - tocoferol. Essa ação faz com que uma maior quantidade de vitamina E fique disponível para exercer sua ação antioxidante, reduzindo assim a peroxidação lipídica pelas EROs (Chow, 1991; McCay, 1985; Niki, 1981).

Estudos *in vitro* mostraram um sinergismo na associação destas vitaminas antioxidantes, embora *in vivo* o resultado tenha sido questionável (Chow, 1991; Mukai et al., 1991; Niki, 1995). Estudo de Park e Lim (2011) demonstrou melhora em marcadores inflamatórios e no fechamento da ferida cutânea de animais diabéticos tratados com dieta contendo vitamina E e C, pela redução dos níveis glicêmicos.

A eficiência na utilização de fármacos ou substâncias antioxidantes, como as vitaminas C e E, que melhore a cicatrização em feridas diabéticas está diretamente

relacionada à via e à forma de administração, assim como a sua concentração no sítio de ação.

1.7 Nanopartículas como Veículos Farmacológicos

O desenvolvimento de novas formas e tecnologias para administração de drogas é um desafio para os pesquisadores. Com o advento da nanotecnologia, sua aplicação em medicina tem sido cada vez mais ampliada. A nanotecnologia envolve a criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas em escala nanométrica, no nível de átomos, moléculas e estruturas supramoleculares (Apuzzo, Liu, 2001; IWGN Workshop, 2000). Em nanotecnologia a unidade de medida é o *nanômetro (nm),* um bilhão de partes de um metro. *Nanopartícula* (1^9) é uma partícula que mede de 1 a 100 nm. Dispositivos em nanoescala são 100-10000 vezes menores que as células humanas (Figura 8) (IWGN Workshop, 2000; Ontario Health Technology Assessment Series, 2006).

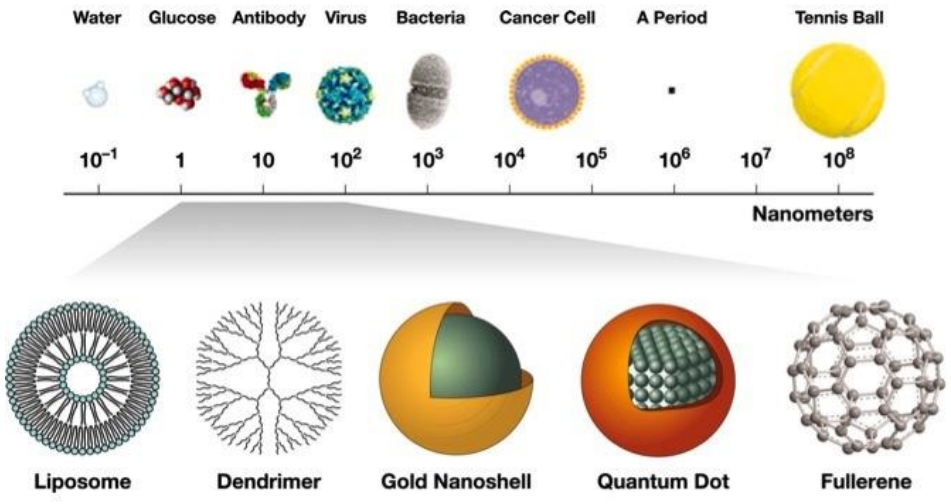


Figura 8 - Tamanho relativo das nanopartículas comparadas a itens comuns.
Fonte: McNeil (2005)

As nanopartículas, além de atuarem como carreadores de drogas para o tratamento de diferentes doenças, podem auxiliar no diagnóstico por imagem (Apuzzo et al., 2008; Doane, Burda, 2012). Melhorar a biodisponibilidade e estabilidade dos agentes bioativos é uma vantagem oferecida pelos sistemas de nanotecnologia (Devalapally et al., 2007), facilitando o direcionamento da droga e

diminuindo a toxicidade (Devalapally et al., 2007; Naahidi et al., 2013). É necessário considerar que cerca de 40% das novas moléculas desenvolvidas não chegam à fase clinica de estudo por falha em sua eficácia e segurança, devido à sua baixa propriedade biofarmacêutica, que se traduz por baixa biodisponibilidade e propriedades farmacocinéticas indesejáveis (Devalapally et al., 2007; Naahidi et al., 2013).

Nanopartículas de primeira geração são, por exemplo, lipossomos, nanopartículas de prata, nanopartículas ligadas à albumina, dentre outras; como exemplos de nanopartículas de segunda geração destacam-se os nanotubos de carbono, nanoscristais, *Quantum Dot*, dendrímeros, nanocápsulas, nanoesferas e nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs), dentre outras (Devalapally et al., 2007; Gowda et al., 2013; Gupta et al., 2013; Naahidi et al., 2013; Ontario Health Technology Assessment Series, 2006).

Vários produtos baseados em nanotecnologia já estão no mercado, como o Doxil® (injeção de lipossomos com cloridrato de doxorrubicina) e Abraxane (partículas que se ligam às proteínas de paclitaxel para suspensão injetável) (Devalapally et al., 2007; Naahidi et al., 2013). Cada nanodispositivo é capaz de armazenar diferentes tipos de componentes, sejam eles orgânicos (como lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos) ou inorgânicos (como os metais) (Gowda et al., 2013; Gupta et al., 2013; Ontario Health Technology Assessment Series, 2006). As vias de administração são as mais variadas, como oral (Ulbrich, Lamprecht, 2010), parenteral ou tópica (Gupta et al., 2013).

Permeabilidade, solubilidade, grau de ionização, lipofilicidade, absorção gastrointestinal, estabilidade da droga nos fluidos biológicos, farmacocinética, farmacodinâmica e propriedades de ligação da droga às proteínas são considerações importantes para o desenvolvimento de uma nova droga (Devalapally et al., 2007).

Na pele, a penetração das nanopartículas na epiderme é requerida para uma eficiente ação das drogas ou materiais de interesse (Gupta et al., 2013). Com características semelhantes à pele são mais fáceis de penetrar essa barreira e / ou atuar sobre ela, auxiliando no tratamento.

Na intenção de direcionar fármacos ao sítio de ação, sistemas carreadores lipídicos vêm sendo utilizados com o objetivo de aperfeiçoar o transporte e a liberação de substâncias ativas, otimizando sua eficiência no organismo através do

controle de parâmetros que incluem o aumento da biodisponibilidade, controle de liberação e redução de efeitos adversos resultantes de sua absorção sistêmica (Caminade et al., 2010; Esmaeili et al., 2008; Licciardi et al., 2010; Semete et al., 2010).

Os sistemas de entrega em escala nanométrica são classificados em dois grupos: a) líquidos: nanoemulsões, nanolipossomosas e nanopolimersomes e b) sólidos: nanopartículas lipídicas (compostas por nanopartículas lipídicas sólidas- NLSs e carreadores lipídicos nano estruturados- CLNs), nanoparticulas poliméricas (compostas por nanoesferas e nanocápsulas) e nanocristais (Borel, Sabliov, 2014).

A manteiga de cacau tem sido utilizada como matéria - prima para a confecção de nanodispositivos. O cacau e seus derivados, exceto a manteiga de cacau, são ricos em polifenóis, especialmente flavonoides, que são antioxidantes naturais (Gasser et al., 2008; Jalil, Ismail, 2008). A quantificação por CLAE mostrou que a manteiga de cacau é composta principalmente de triglicerídeos (Beppu et al., 2013; Buchgraber et al., 2004), ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C12:0), ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e ácido arácdico (C20:0) (Buchgraber et al., 2004). Alfa-tocoferol e tocotrienol também fazem parte da composição da manteiga de cacau, mas a quantidade destes componentes depende da origem do produto (Buchgraber et al., 2004; Gasser et al., 2008).

Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) foram desenvolvidas por Müller (2000), com base nas emulsões para nutrição parenteral, introduzidas na rotina clínica nos anos 1950. As NLSs são sistemas coloidais que apresentam liberação controlada, boa biodisponibilidade, distribuição e direcionamento das drogas nos diversos tecidos (Naahidi et al., 2013). Por estas razões têm sido utilizadas para o tratamento de uma variedade de doenças como artrite reumatóide, esclerose múltipla, uveíte e doença inflamatória da bexiga (Ulbrich, Lamprecht, 2010), doença de Parkinson e doenças cardio – cérebro - vasculares (Puri et al., 2009).

Partículas hidrofóbicas como as NLSs sofrem o processo de opsonização de forma mais rápida que as partículas hidrofílicas, devido à melhor adsorção das proteínas do soro em suas superfícies. Os macrófagos e células fagóciticas da circulação sistêmica são capazes de reconhecer as opsoninas de superfície e rapidamente removem as nanopartículas da circulação sistêmica (Borel, Sabliov, 2014; Devalapally et al., 2007). É preciso considerar, no entanto, que a

possibilidade de se alcançar uma liberação controlada da substância veiculada por NLSs é limitada pelo estado líquido do carreador. Sendo assim, a utilização de um lipídeo sólido em substituição ao óleo mostrou - se uma estratégia interessante para o controle da liberação, uma vez que a mobilidade do fármaco poderia ser consideravelmente reduzida (Mehnert, Mäder, 2001).

Há três modelos de incorporação de drogas pelas NLSs, isso irá depender da sua solubilidade que ira resultar nos seguintes modelos: 1 - Modelo de solução sólida; 2 - Modelo invólucro enriquecido com droga, com matriz lipídica; 3 - Modelo invólucro lipídico, com a droga enriquecendo a matriz (Figura 9).

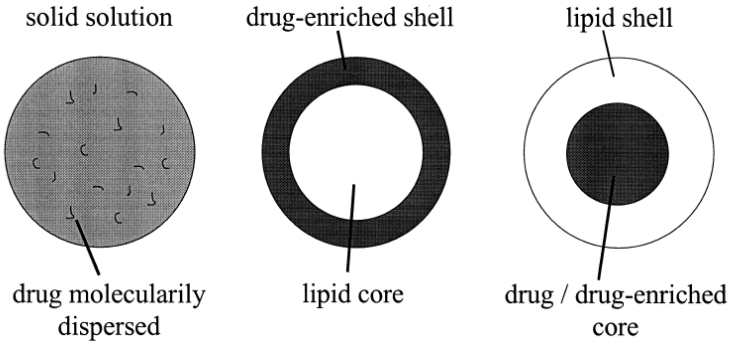


Figura 9 - Três modelos de incorporação de medicamentos pelas NLSs. Modelo de solução sólida (esquerda); 2. Modelo invólucro enriquecido com drogas, com matriz lipídica (centro); 3. Modelo invólucro lipídico, com a droga enriquecendo a matriz (direita). Fonte: Muller et al. (2000).

No começo dos anos 1990 foram desenvolvidas as NLSs, derivadas de emulsões óleo/água (O / A), por simples substituição do óleo por um lipídeo sólido, o qual permanece nesse estado sob a temperatura corporal (Müller et al., 2007). Atualmente existe a segunda geração de NLSs, representada pelos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs), os quais foram desenvolvidos a partir da blenda de um lipídeo sólido com um lipídeo líquido, a qual também se apresenta sólida à temperatura ambiente (Müller et al., 2007). A vantagem da segunda geração é a maior capacidade de carga de ativos em comparação às NLSs e, ainda, firme inclusão do ativo dentro da matriz da partícula durante períodos de estocagem (Stecová et al., 2007).

A produção de NLSs inicia-se com a incorporação do fármaco na massa lipídica fundida, que é em seguida dispersa em uma solução aquosa do tensoativo aquecida à mesma temperatura da fase lipídica. A pré - emulsão obtida é submetida à ação de um homogeneizador de alta pressão, etapa que pode ser repetida diversas vezes. O

produto resultante é uma nanoemulsão O / A, devido ao estado líquido do lipídeo. Contudo, após o resfriamento, ocorre a recristalização do lipídeo, levando à formação de nanopartículas lipídicas com matriz sólida (Mehnert, Mäder, 2001). A preparação de CLNs é idêntica à de NLS, variando - se apenas os materiais de partida, conforme discutido anteriormente (Müller et al., 2007).

A distribuição *in vivo* e, consequentemente, a vetorização de nanopartículas é influenciada pelo diâmetro, carga de superfície, composição da superfície e hidrofobicidade. Parâmetros como diâmetro e distribuição do diâmetro são de grande importância para determinar a interação da nanopartícula com a membrana celular e a capacidade de atravessar barreiras fisiológicas (Brannon – Peppas, Blanchette, 2004). Ainda, é possível monitorar a estabilidade físico - química da formulação com a avaliação do diâmetro em função do tempo (Magenheim, Benita, 1991). Paralelamente, a determinação da carga de superfície é importante para verificar uma possível formação de *cluster*, aderência ou interação com a membrana celular (Feng, 2004).

O planejamento de nanocarreadores contendo fármacos envolve uma série de estudos de pré - formulação visando á obtenção de formulações realmente nanotecnológicas (que apresentam tamanho nanométrico de partículas), com adequada eficiência de encapsulação do fármaco, estabilidade físico - química e biocompatibilidade. O desenvolvimento destes sistemas, contemplando uma detalhada etapa com caracterização físico – química, utilizando de métodos analíticos otimizados e validados é fundamental para a otimização da ação terapêutica de substâncias bioativas nanoencapsuladas (Mora-Huertas et al., 2010; Schaffazick et al., 2003).

2 OBJETIVOS

Devido ao fato de:) o estado hiperglicêmico causado pelo diabetes propiciar a exacerbação da geração de radicais livres por diferentes tipos celulares durante a cicatrização;) o estresse oxidativo desempenhar um papel negativo na migração de diferentes tipos celulares envolvidos node cicatrização e) a associação de antioxidantes a partículas lipídicas sólidas (NLS) ser economicamente viável, estáveis, boa penetrabilidade e reduzida possibilidade de efeitos colaterais este projeto teve como principal objetivo avaliar a eficácia da administração sistêmica de antioxidantes (combinação de vitaminas E e C) via oral, e tópica (vitamina E) ndo na aceleração da cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos. Para a administração tópica, testar a utilização das NLSs como veículos de administração .

Caso os resultados obtidos sejam satisfatórios, espera-se testar futuramente este veículo em humanos e implantar uma nova terapia para o tratamento de feridas crônicas, reduzindo assim o custo gerado por este problema ao sistema público de saúde.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Aloxana (Sigma-Aldrich / St. Louis, MO- USA)
- DL-α-Acetato de tocoferol - EMPROVE®USP, Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Ácido Ascórbico (Sigma-Aldrich / St. Louis, MO- USA)
- Formaldeído 4% (Sigma-Aldrich / St. Louis, MO- USA)
- Paraplast® (Sigma-Aldrich / St. Louis, MO- USA)
- Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich / St. Louis, MO- USA)
- Isoflurano (BioChimico/ Rio de Janeiro, RJ-Brasil)
- Colagenase tipo XI (Sigma-Aldrich / St. Louis, MO- USA)
- Hialuronidase tipo I-s (Sigma-Aldrich / St. Louis, MO- USA)
- Colagenase tipo I (Sigma-Aldrich / St. Louis, MO- USA)
- Aprotinina (Sigma-Aldrich / St. Louis, MO- USA)
- Fc Blocking (Macs Miltenyi Biotec/Bergisch Gladbach-Germany)
- Hidroxitolueno butilado (BHT) (Sigma-Aldrich / St. Louis, MO- USA)
- Manteiga de cacau (Cosme Trate/Porto Alegre-RS/Brasil)
- Span 80 (Sigma-Aldrich / St. Louis, MO- USA)
- Vitamina E (acetato de tocoferol) (Cosme Trate/Porto Alegre-RS/Brasil)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich / St. Louis, MO- USA)
- Carbopol® Ultrez (Lubrizol/ Cleveland, Ohio-USA)

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos, da linhagem Swiss (*Mus Musculus*, ordem Rondentia mammalia, família Muridae), com 60 dias de idade, provenientes do Biotério de Camundongos do Departamento de Farmacologia do ICB/USP.

Os animais receberam dieta (ração NUVILAB CR-1, Sogorb) e água *ad libitum* e foram mantidos sob condição padrão de luminosidade (ciclo de 12 horas claro/escuro) e em temperatura aproximada de 22 ºC**.** Todos os experimentos realizados estavam de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL). O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, registrado sob **nº 035** nas fls.**101** do livro **02**, em **24.03.2011**, com validade de 03 anos (em anexo).

3.3 Procedimentos Experimentais

3.3.1 Indução do Diabetes Mellitus (DM)

Todos os animais foram submetidos a jejum de 18 a 22 horas prévio à indução do DM. Diabetes Mellitus foi induzido por injeção intravenosa (veia caudal) de Aloxana (70 mg/kg em tampão citrato de sódio 0,1 M). Esta droga destrói células β pancreáticas pelo aumento da produção de EROs (Goldner, 1945). A taxa de sucesso na indução foi de 90%, sem necessidade de reaplicação da droga. Animais do grupo controle receberam apenas o veículo. Após 72 horas da indução, a glicemia foi aferida em jejum de 4 horas, utilizando o aparelho Accus - Chek (Roche Diagnostics Brasil). Apenas os animais com glicemia superior a 350 mg/dL foram considerados diabéticos. Após 30 dias de DM os animais foram submetidos à confecção da ferida.

O consumo alimentar e a ingestão de água foram quantificados a cada dois dias. A ingestão alimentar absoluta foi calculada pela diferença entre a quantidade de dieta oferecida e a rejeitada após 48 horas. O peso e a glicemia foram medidos no 1° e 30º dias após a indução do DM, e também no 13º dia pós - lesão, em todos os animais. O volume urinário foi medido durante um período de 22 horas em gaiola metabólica.

3.3.2 Confecção da ferida

Para a confecção da ferida, os animais foram induzidos ao relaxamento e narcose utilizando-se mistura de xilazina/cetamina (40 mg/kg de peso cada), por via intraperitoneal. A confecção da ferida foi realizada no dorso dos animais após

tricotomia, com auxílio de um molde (3 cm^2 de diâmetro), vazado no centro (espaço de 1 cm^2 de diâmetro). Utilizando-se o molde e uma caneta porosa foi feita uma marcação na pele; a área demarcada (1 cm^2) foi removida cirurgicamente utilizando - se pinça dente de rato e tesoura pequena de ponta fina. Em seguida os animais foram colocados em gaiolas individuais (7,5 x 12 cm) e aquecidos (sob luz, com proteção ocular) para evitar hipotermia. Os animais receberam uma dose do analgésico paracetamol (75 mg/kg de peso), após a cirurgia. Os animais permaneceram em gaiolas individuais ao longo dos experimentos.

3.3.3 Tratamento Sistêmico com Antioxidantes (Vitamina E e C)

O tratamento com as vitaminas antioxidantes iniciou - se no 1º dia da lesão, seguindo-se até o 14º dia pós-lesão. As vitaminas E (DL – α - Acetato de tocoferol (Figura 10), miscível em água (EMPROVE®USP, Merck) e a vitamina C (Ácido Ascórbico, Sigma - Aldrich), foram diluídas em água mineral, pH 7,4, à temperatura ambiente (TA).

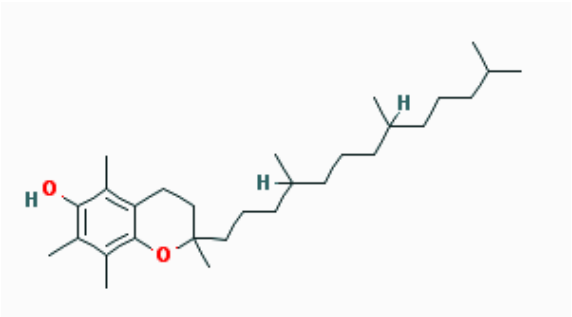


Figura 10 - Conformação estrutural vitamina E hidrossolúvel. Estrutura química da DL-α-Acetato de tocoferol (vitamina E).
https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2116&loc=ec_rcs

As concentrações combinadas testadas inicialmente durante a padronização foram:

- Vitamina E e C (40/100 mg/kg de peso, respectivamente);
- Vitamina E e C (80/200 mg/kg de peso, respectivamente);

A fim de determinar o volume de solução de antioxidantes a ser administrado para cada grupo de animais, a ingestão de água nos grupos Controle com Antioxidantes (C + AO) e Diabético com Antioxidantes (D + AO) foi avaliada

previamente em diferentes períodos, das 06 : 00 h às 18 : 00 e das 18 : 00 h às 06 : 00 h. Para os experimentos as vitaminas foram então diluídas em água mineral (35 ml para os animais diabéticos e 10 ml para os animais controle) e ofertadas em bebedouros de plástico para roedores (50 ml) pelo período de 12 horas. O tratamento foi realizado no período da noite, por ser o período de maior ingestão de água dos animais, além de contribuir para a proteção das vitaminas contra a ação direta da luz. O volume residual de solução foi medido diariamente para todos os animais tratados.

Para todos os grupos, o consumo alimentar e a ingestão de líquidos foram medidos a cada dois dias. O peso e a glicemia foram medidos nos 1° e 13º dias da suplementação. Os animais foram mantidos por um período de 22 horas em gaiolas metabólicas para medir o volume urinário.

3.3.4 Análise de Estabilidade dos Antioxidantes (Vitamina E e C) por Espectrofotometria Visível e Ultravioleta

A medida da estabilidade das vitaminas E e C em água foi feita em espectrofotômetro da marca UV - 1800 PC (Spectrophotometer Pró-análise) e analisado pelo programa M.Wave Professional 2.0. Fez - se uma varredura entre os comprimentos de onda 500 e 200 nm. O comprimento de onda para a leitura da vitamina C foi de 268 nm e da vitamina E foi de 298 nm. As medidas foram feitas no tempo zero (momento da diluição), 4 h, 8 h e 12 h após a diluição de 1 : 10 das vitaminas em balões volumétricos individuais. As análises foram feitas em triplicata.

3.3.5 Cinética de fechamento das feridas

A região da ferida foi fotografada com câmera digital Sony Cyber - shot (model DSC - S730 7.2MP 3 X Optical zoom) a uma distância fixa de 20 cm. A área das feridas foi medida utilizando-se o programa Image J (NIH) nos dias: zero (imediatamente após a confecção), 3º, 7º, 10º e 14° pós - lesão. Para capturar as imagens sem estressar o animal fizemos a narcose com isoflurano (BioChimico).

3.3.6 Fixação e processamento do tecido

A pele removida foi posicionada em pedaços de cortiça e fixada em formaldeído 4% (Sigma) por 8 horas, à temperatura de 8 ºC. As amostras foram desidratadas e diafanizadas em baterias de etanol (70%, 95% e 100%) e de Xilol (I e II), cada passagem com 1 hora de duração, e incluídas em Paraplast®. Cortes com 7 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotatório manual (820 Spencer Microtome) e estendidos sobre lâminas previamentes cobertas com Poly – L - Lysine (Sigma).

3.3.7 Análises Morfológicas

A análise morfológica foi realizada após coloração com Hematoxilina/Eosina (H&E), em microscópio, Nikon Eclips E600 – Microscope. Para as fotomicrografias foi utilizada câmera CF160epi - fluorescense optic. A avaliação da distribuição de colágenos fibrilares foi feita pela coloração de Picrosirius (histoquímica), utilizando - se corante Sirius Red e posterior análise em microscópio de polarização.

3.3.8 Citocinas inflamatórias

As citocinas inflamatórias IL - 1β, TNF - α, KC (IL -8), IL - 12p40 e IL - 4 foram avaliadas por ELISA no homogenato do raspado (derme) na área da lesão, no 3º e 14º dias após a confecção da ferida, e também em animais sem lesão, nas idades correspondentes às análises da derme lesionada. Foram analisados todos os grupos de animais tratados sistemicamente e topicamente, utilizando-se kits Duo Set (R&D System, mineapolis, MN, USA).

A homogeneização do tecido foi feita com homogeneizador utltrasônico, 40% da frequência do aparelho, por 3 vezes durante 10 segundos no gelo, em tampão PBS pH 7,4, contendo os inibidores de proteases, PMFS 0,5 mM e aprotinina80 UI/ml, em gelo. Em seguida, centrifugou - se o homogenato a 12.000 rpm a 4ºC por 10 minutos, e separou - se o sobrenadante para a realização do experimento.

3.3.9. Citometria de Fluxo para marcadores celulares

O isolamento de leucócitos da derme foi feito após digestão do tecido com colagenase tipo XI (125 U/ml), hialuronidase tipo I-s (60 U/ml) e colagenase tipo I

(450 U/ml) por 1 h em banho - maria a 37 ºC e posterior filtração em uma malha de 70 µM para separação das células (Galkina et al., 2006).

Foram utilizadas amostras de derme no 3º e 14º dias pós - lesão e também de derme sem lesão em todos os grupos. Os anticorpos monoclonais utilizados foram anti - Ly6G APC (neutrófilos), anti - MIG PE (macrófago do tipo 1), anti - CD11b Pacífic Blue (granulócitos) e anti - CD206 FITC (macrófago do tipo 2) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA).

As amostras foram bloqueadas com Fc Blocking (Macs Miltenyi Biotec) (1/100 em tampão FACS), agitadas e colocadas na geladeira (2 - 8 graus) por 20 minutos, em seguida lavadas com tampão FACS, centrifugadas por 5 minutos a 1.200 rpm, a 4 ºC, e o sobrenadante desprezado.

As células foram marcadas com os anticorpos citados acima, diluídos em tampão FACS, homogeneizadas rapidamente e incubadas por 30 minutos na geladeira. Após o tempo de incubação as amostras receberam 300 ul de tampão FACS e centrifugadas por 05 minutos a 1.200 rpm, a 4 ºC, desprezou-se sobrenadante e as células foram fixadas com formaldeído 0,4% para se fazer as analises.

As amostras foram analisadas por citometria de fluxo utilizando - se um equipamento FACSCanto e FACSDiva software (BD Biosciences) e, em seguida, analisadas com FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, EUA). As voltagens de fluorescência foram determinadas usando células correspondentes não coradas. Cinquenta mil eventos foram adquiridos e a positividade foi considerada de acordo com o controle de isotipo do respectivo anticorpo.

3.3.10 Quantificação de Hidroperóxido Lipidico (LPO)

Para extração de lipídeos da derme e analise quantitativa do LPO utilizou-se kit para dosagem de hidroperóxido lipídico (LPO) (Cayman - USA; 705002).

3.3.11 Ensaios de atividade de enzimas do sistema antioxidante

3.3.11.1 Determinação da atividade da catalase

A atividade da catalase foi determinada em todos os grupos. O princípio da reação consiste da ação da catalase presente na amostra para dismutar o H_2O_2 (cuja concentração é conhecida), em água e oxigênio molecular. Numa segunda etapa, o H_2O_2 restante é determinado pela oxidação do reagente o - dianisidina via reação catalizada pela peroxidase (HRP) (Fossati et al.,1980). A velocidade de formação do produto de oxidação da o-dianisidina foi avaliada registrando-se a absorbância da amostra (D.O. 460 nm) em intervalos de 10 segundos durante 10 minutos. A atividade da enzima foi expressa em U Catalase/mg de proteína, sendo a unidade da catalase é definida como a concentração de H_2O_2 (µmol) degradada min^{-1}.

3.3.11.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada em todos os grupos. O método baseia-se na formação do produto XTT - formazan (modificado de Ukeda et al., 1997). A reação ocorre entre a xantina, xantina oxidase e SOD, produzindo o ânion superóxido. Este, por sua vez, induz a redução do reagente XTT para um produto XTT - formazan, que absorve luz (D.O 470 nm). A SOD sequestra o ânion superóxido e reduz a formação do produto XTT - formazan. O resultado foi expresso como U SOD/mg de proteína, sendo a unidade de SOD definida como a quantidade de SOD capaz de transformar 1 µmol/min de O_2.

3.3.11.3 Determinação da atividade de glutationa peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada em todos os grupos. O método baseia-se na medida indireta da atividade da GPx, por meio de uma reação casada com a glutationa redutase (GR). A glutationa oxidada (GSSG), produzida por redução via hidroperóxidos pela GPx, é reciclada para gerar seu estado reduzido pela GR e NADPH (Flohé, 1984). O substrato utilizado foi o terc - butil hidroperóxido. A oxidação de NADPH a $NADP^+$ foi acompanhada pelo decaimento da absorbância a

340 nm à temperatura de 37 ^{o}C. As amostras foram analisadas em duplicata e expressas como µmol GSH/min/mg proteína.

3.3.11.4 Determinação da atividade de glutationa redutase (GR)

A medida de atividade da GR foi determinada em todos os grupos. O método baseia-se na medida direta da atividade da GR, que utiliza o NADPH como co - fator na redução da GSSG em GSH. A oxidação de NADPH a $NADP^{+}$ foi acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm à 37 ^{o}C (Carlberg, Mannervik, 1985). As amostras foram analisadas em duplicata e expressas como µmol NADPH/min/mg proteína.

3.3.12 Avaliação do malondialdeído (MDA)

A quantificação de Malondialdeído (MDA) foi realizada em todos os grupos, pela técnica de TBARS (Substâncias Reativas com Ácido Tiobarbitúrico). As amostras de derme foram homogeneizadas em tampão Tris - HCl 10 mM, pH 7,4, contendo Triton – X - 100 0,1%, EDTA 0,5 mM e BHT (Hidroxitolueno butilado) 29,5 mM. O homogenato foi agitado, aquecido a 100ºC por 30 minutos e centrifugado (3000 rpm, 4 ºC por 10 minutos) para obtenção do sobrenadante. A leitura da quantidade de MDA foi feita em placa para leitor de ELISA (Spectramax Molecular Advice) no comprimento de onda de 535 nm. As amostras foram analisadas em duplicata e expressas como MDA/mg proteína.

3.3.13 Preparação das Nanopartículas Contendo Antioxidantes para Tratamento Tópico

3.3.13.1 Caracterização das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs)

As dispersões aquosas das NLSs foram preparadas segundo metodologia adaptada descrita por Müller e colaboradores (2000), conforme a Tabela 1. Manteiga de cacau (Cosmetrate), Span 80 (Sigma) e vitamina E (acetato de tocoferol) (Cosmetrate, nas concentrações de 1% e 2,5%) foram dissolvidas em banho de ultrassom na temperatura 37 ºC. A mistura foi então dispersa sob alta agitação (5 minutos) usando um Ultra - Turrax (T25, Ika) em uma solução de água MiliQ contendo Tween 80 (Sigma), mantida a mesma temperatura da fase lipídica (Tabela 1 -). A pré - emulsão obtida foi homogeneizada sob alta pressão (Panda 2K NS1001L, Niro Saovi), aplicando-se 5 ciclos de 300 bar.

Componentes	Formulações		
	Nano Branco	**NANOVITE 1%**	**NANOVITE 2,5%**
Fase Orgânica			
Manteiga de cacau	10 g	10 g	10 g
Span 80	3 g	3 g	3 g
Vitamina E (acetato de tocoferol)	-	2 g	5 g
Fase Aquosa			
Água MilliQ (q.s.p)	200 mL	200 Ml	200 mL
Tween 80	1,54g	1,54g	1,54g

Tabela 1 - Composição da formulação para confecção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs). Componentes utilizados nas fases orgânica ou lipídica e aquosa para preparo das NLSs.

3.3.13.2 Caracterização Físico - Química da Formulação

3.3.13.2.1 Difratometria de laser

O diâmetro médio e a distribuição de tamanhos de partículas (Span) foram determinados por difratometria de laser (Malvern Mastersizer 2000). O Span é definido como (equação 1):

$$Span = \frac{D(90) - D(10)}{D(50)} \quad (1)$$

Sendo que, $D_{(10)}$, $D_{(50)}$ e $D_{(90)}$ representam os diâmetros cumulativos de 10%, 50% e 90% das partículas, respectivamente. Essa técnica foi utilizada devido à sua capacidade de analisar uma ampla faixa de tamanhos de partículas, possibilitando a verificação da presença de partículas micrométricas.

3.3.13.2.2 Determinação de pH, condutividade e viscosidade das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) e Géis

Logo após a preparação, a determinação do pH foi realizada em potenciômetro (B474 Micronal) calibrado com soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0, diretamente nas suspensões coloidais. Os resultados representam a média de 3 determinações.

A determinação da condutividade foi realizada em condutivímetro (Gehaka, modelo CG 1800, Brasil), diretamente nas formulações coloidais.

A viscosidade das NLSs foi avaliada em Viscosímetro Vibracional (A&D Company, modelo SV10, Japão). No período de 30 segundos, sete medições foram feitas e os resultados foram expressos em mPa x s (média ± SD). Para os géis contendo NLs, as análises de viscosidade foram conduzidas em Viscosímetro Rotacional (Brookfield, modelo LV – DV – II + Pro, USA), utilizando spindle SC4 - 25. Os géis foram acondicionados em dispositivo Brookfield acoplado a banho termostatizado com água circulante a 25 ºC ± 1 ºC. As taxas e tensão de cisalhamento foram medidas nas velocidades de 0,75 rpm e 3 rpm e expressas em centipoise (cp) (média ± DP).

3.3.13.2.3 Determinação do diâmetro médio das partículas e polidispersão das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) e Géis

O diâmetro médio e a polidispersão das NLSs foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (equipamento Zetasizer nanoseries, Malvern Instruments, modelo ZEN 3600). Para análise, as nanopartículas foram diluídas em

água MiliQ filtrada. Estas análises foram conduzidas em triplicata.

Os diâmetros das NLSs dispersas no gel também foram avaliados. O gel (0,025 g) foi disperso em q.s.p de água MilliQ num balão volumétrico de 25 ml, com auxílio de um vórtex.

3.3.13.2.4 Monitoramento das Nanopartículas Lipídicas (NLSs)

O monitoramento das NLSs foi realizado com o equipamento NanoSight LM20 (NanoSight®, Amesbury, Reino Unido). As formulações foram diluídas (5000 X) em água MilliQ® e injetadas na câmara de amostra. O sistema consiste em um feixe de luz laser a 640 nm, o qual incide sobre as amostras, cujo espalhamento é captado durante um tempo pré - determinado utilizando - se obturador e ajustes de ganho manuais. Os dados são coletados e analisados através do software NTA 2.0 Build 127 que identifica e rastreia nanopartículas individuais que se deslocam em movimento browniano e relaciona o movimento para um determinado tamanho de partícula. Os resultados correspondem à média aritmética dos valores calculados com os tamanhos de todas as partículas analisadas pelo equipamento.

3.3.13.2.5 Teor do fármaco na formulação e eficiência de encapsulação

O teor da vitamina E (1% e 2,5%) nas formulações foi determinado por CLAE (Cromatografia Liquida de Alta Eficiência), utilizando-se uma pré - coluna com fase estacionária LiChrosorb RP - 18 4 mm (Merck) acoplada à coluna de aço inoxidável LiChrosorb RP-18 Merck. Uma alíquota de 100 µl da suspensão foi diluída em q.s.p de metanol em balão volumétrico de 10 ml, filtrada (Millipore 0,45 µm) e injetada no CLAE. O método utilizado foi previamente desenvolvido e validado por Pereira (2013).

Para medir a eficiência de encapsulação foi utilizada a técnica de ultrafiltração/centrifugação, na qual 200 µl da formulação foram colocados em um filtro (Amicon® Milipore 10.000 Da), centrifugados a 5000 rpm durante 5 minutos à TA, e posteriormente 20 µl do ultrafiltrado foram injetados no CLAE para avaliar o percentual de encapsulação da vitamina E.

3.3.13.2.6 Preparo do gel

Para o preparo do gel utilizou-se Carbopol® Ultrez (0,5%), 02 gotas de trietanolamina e 25 ml da suspensão contendo as nanopartículas.

3.3.14 Aplicação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs)

Os camundongos foram divididos em quatro grupos: Grupo 1**:** apenas o Gel (Controle Gel - CG e Diabético Gel – DG), Grupo 2: apenas as NLSs vazias (Controle Nano Branco – CNB e Diabético Nano Branco - DNB)**,** Grupo 3: Nano Vitamina E 1% (Controle NANOVITE 1% - CVITE 1% e Diabético NANOVITE 1% - DVITE 1%) e Grupo 4: Nano Vitamina E 2,5% (Controle NANOVITE 2,5% - CVITE 1% e Diabético NANOVITE 2,5% - DVITE 2,5%). Logo após a lesão, fez-se a aplicação de 0,3g dos diferentes tratamentos na área lesionada, com o auxilio de uma micropipeta (volume determinado) e espátula para espalhamento. O tratamento foi realizado 1 x ao dia, sempre no mesmo horário, no período de 03 e 14 dias pós - lesão. Diversas análises já descritas foram realizadas tanto para animais que receberam tratamento sistêmico com antioxidantes quanto para animais que receberam o tratamento tópico.

3.3.15 Análise Estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) dois fatores (estado fisiológico e tratamento) e teste *t Student*, quando necessário. Pós - teste Bonferroni foi aplicado para verificar diferença entre os grupos. Os valores foram apresentados em média ± erro padrão (SEM) da média para o número de animais utilizados (n). Utilizou-se o programa Prisma 3.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA), com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Parte I - Tratamento Sistêmico com Vitaminas Antioxidantes (AO)

4.1.1 Estabilidade e parâmetros utilizados para a escolha da concentração das vitaminas para o tratamento

Conforme descrito anteriormente, a estabilidade das vitaminas E e C dissolvidas em água foi avaliada ao longo de 24 horas. A vitamina E, no final de 12 horas, reduziu apenas 25%, enquanto a vitamina C, no mesmo período, teve uma redução de 87%.

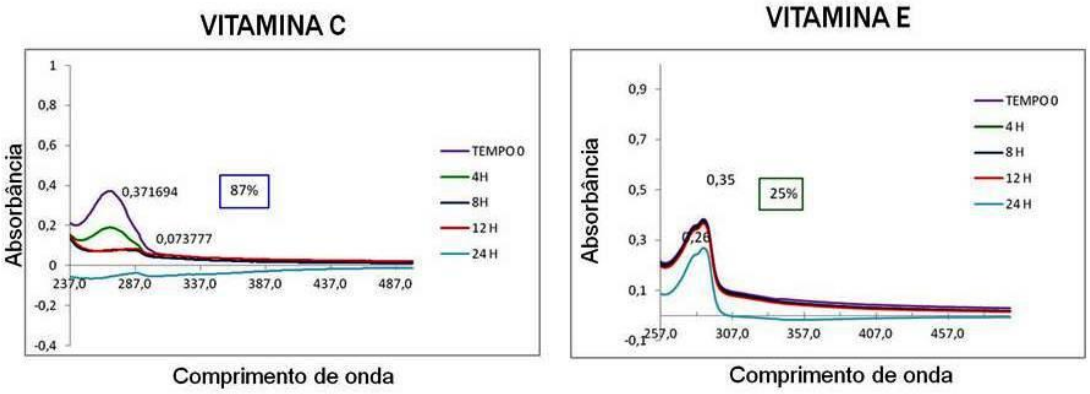


Figura 11 - Análise da estabilidade das vitaminas E e C em solução aquosa por espectrofotometria visível e ultravioleta (UV) ao longo de 24 horas. Valores representam a medida da absorbância em relação ao tempo. As concentrações utilizadas foram de 40 mg de vitamina E e 100 mg de vitamina C, por kg de peso.

A princípio, utilizando - se duas concentrações diferentes de vitaminas E (40 e 80 mg/Kg) e C (100 e 200 mg/Kg), foram feitas avaliações do consumo de vitaminas pelos animais, medidas de fechamento da lesão, glicemia e do peso corpóreo.

Os animais diabéticos tratados com as concentrações mais elevadas consumiram 78% do volume ofertado ao longo de 14 dias, enquanto os animais diabéticos tratados com concentrações mais baixas consumiram 87% do volume ofertado.

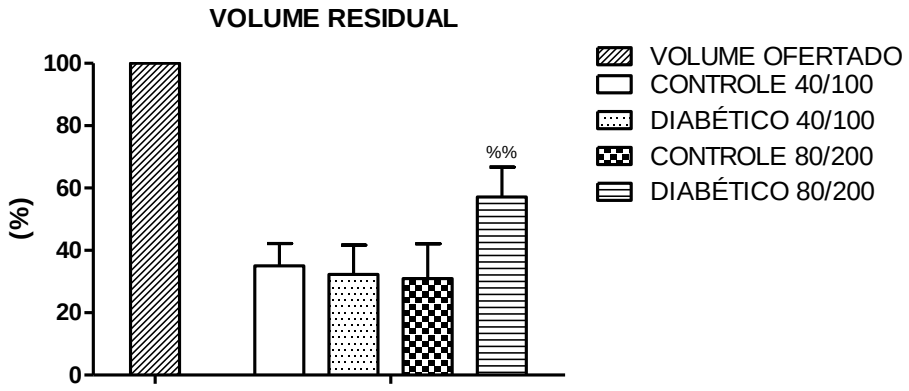


Figura 12 - Análise do volume residual da solução contendo vitaminas antioxidantes (AO) ofertada aos camundongos. As concentrações testadas foram de 40/100 mg/kg e 80/200 mg/kg de vitaminas E e C, respectivamente. Os valores são apresentados como média ± DP. (%%) $p < 0.01$ para diferença significativa em relação aos demais grupos, como indicado por ANOVA two-way e pós-teste de Bonferroni.

O tratamento com antioxidantes nas duas concentrações testadas reverteu o atraso observado no fechamento de feridas de animais diabéticos no 14º dia, não havendo diferença entre os grupos (área da ferida 10,0 ± 31 cm^2 para 80/200 mg/kg vs.,12,5 ± 3,1% para 40/100 mg/Kg).

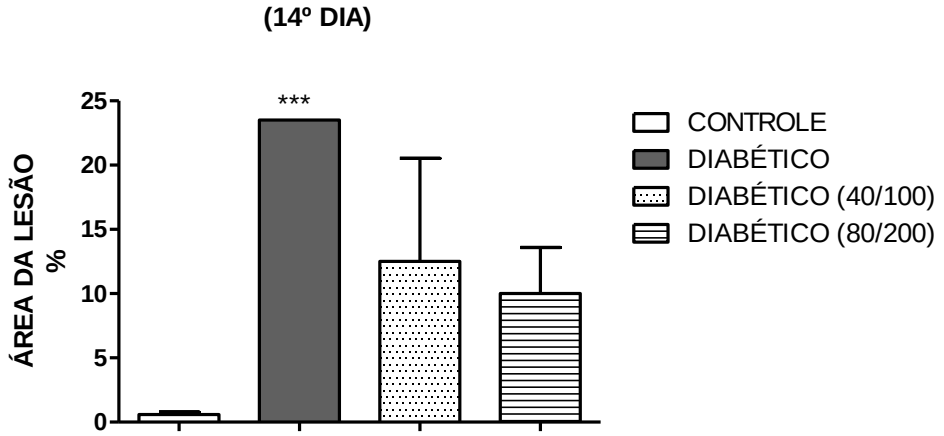


Figura 13 - Análise morfométrica da ferida no 14º dia pós - lesão em animais não tratados ou que receberam diferentes concentrações de vitaminas antioxidantes (AO). As concentrações testadas foram de 40/100 mg/kg e 80/200 mg/kg de vitaminas E e C, respectivamente. Os valores são apresentados como média ± DP. (***) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao controle não tratado, como indicado por ANOVA two-way e pós-teste de Bonferroni.

O tratamento com vitaminas antioxidantes (AO) pelo período de 14 dias não alterou a glicemia dos animais, quando comparados aos animais não tratados. O tratamento, portanto, não alterou o estado hiperglicêmico nos diabéticos. Não houve diferença entre as concentrações testadas (Tabela 2 -).

Animais diabéticos apresentaram peso corporal aproximadamente 33% menor que o peso dos animais controles, o que não foi modificado pelo tratamento com antioxidantes (AO). Não houve diferença entre as concentrações testadas (Tabela 2 -).

Variáveis	**Grupos**					
	Controle	Diabético	Controle AO (40/100 mg/kg)	Diabético AO (40/100 mg/kg)	Controle AO (80/200 mg/kg)	Diabético AO (80/200 mg /kg)
Glicemia mg/dl	133,20±704 (09)	525±19,50*** (09)	103,20±7,66 (04)	572±29*** (06)	121,20±5,70 (04)	544,25±17,50 (06)
Peso (g)	44,25±1,50 (04)	33,67±0,98*** (06)	44±1,47 (04)	30,50±0,80*** (06)	43,73±1,25 (04)	27,50±1,40*** (06)

Tabela 2 - Glicemia e peso corporal de animais não tratados e tratados com diferentes concentrações de vitaminas antioxidantes (AO). As concentrações testadas foram 40/100 mg/kg e 80/200 mg/kg de vitaminas E e C, respectivamente. Valores expressos como média ± EPM, número de camundongos entre parênteses. (***) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao controle não tratado, como indicado por ANOVA two-way e pós-teste de Bonferroni.

Considerando que não foram observadas diferenças nos parâmetros analisados entre animais tratados com as diferentes concentrações de vitaminas E e C, mas que o consumo da solução com contendo concentrações mais baixas foi maior, optamos por utilizar, nos experimentos seguintes, a concentração de 40/100 mg/Kg de vitaminas E e C, respectivamente.

4.1.2 Efeitos do tratamento sistêmico com vitaminas antioxidantes sobre o fechamento das feridas

No 14º dia pós – lesão, a ferida estava fechada nos animais controle, enquanto os animais diabéticos apresentavam atraso no fechamento e, frequentemente, persistência de crosta, na área da lesão. A lesão nos animais diabéticos geralmente fechava aos 18 dias (Figura 14 -).

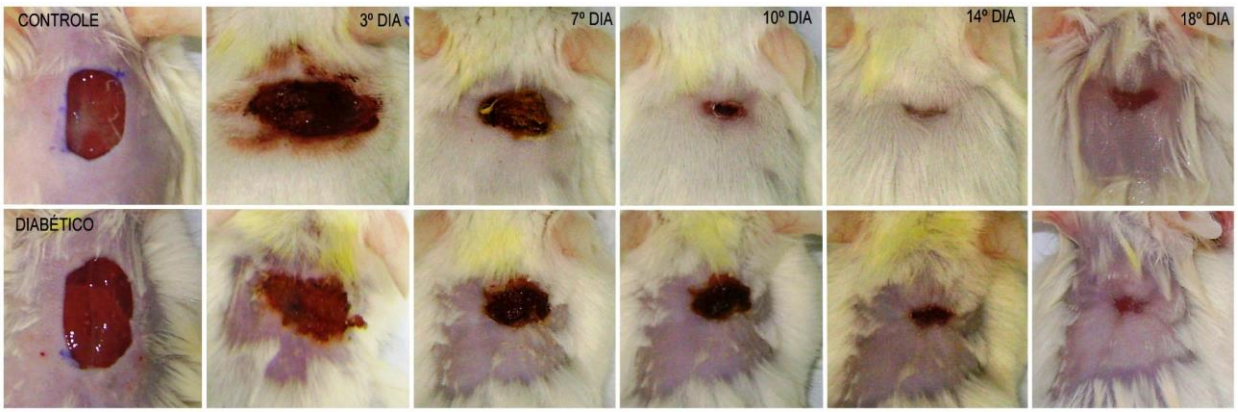


Figura 14 - Evolução da cicatrização em animais controles e diabéticos no 3º, 7º, 10º, 14º e 18º dias pós - lesão.

O tratamento com antioxidantes na concentração de 40/100 mg/Kg de vitaminas E e C, respectivamente, não alterou o fechamento da ferida nos animais controles, mas reverteu parcialmente o atraso no fechamento da ferida em diabéticos (Figura 15 -).

A)

B)

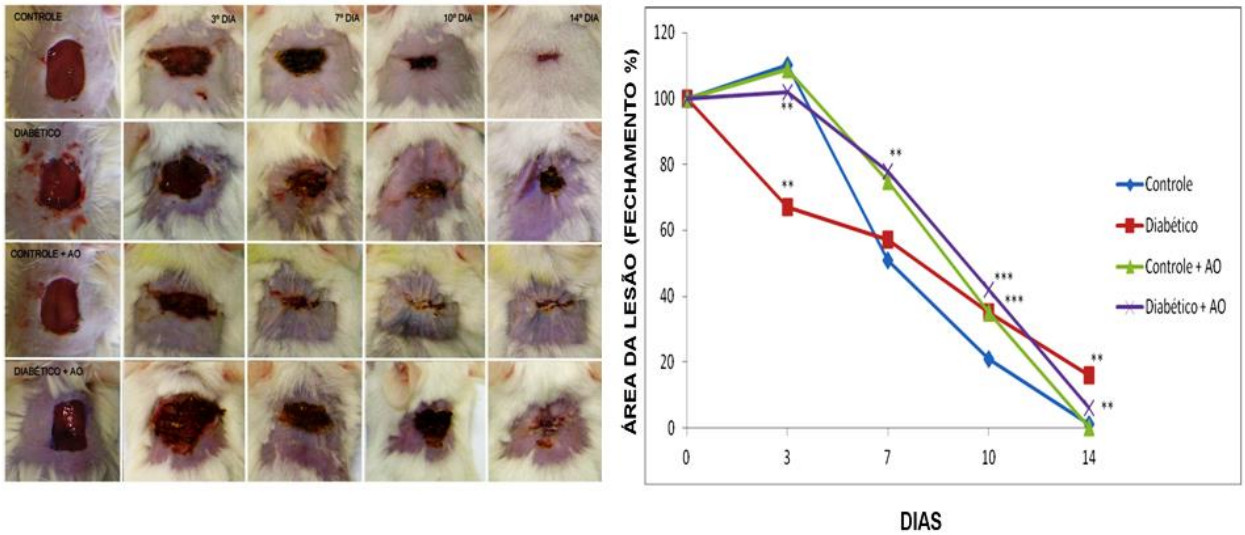


Figura 15 - Processo de cicatrização mostrando as diferentes fases de fechamento nos 3º, 7º, 10º e 14º dias pós – lesão em animais controles e diabéticos com e sem tratamento com vitaminas antioxidantes (AO). A) Painel apresentando a progressão do processo de cicatrização em animais controles e diabéticos não tratados e tratados com antioxidantes (AO); **B)** Gráfico representando a porcentagem do fechamento da área, mínimo de 12 animais por grupo. Tratamento com concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C. Os valores são apresentados como média ± EPM. (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ para diferença significativa em relação ao controle não tratado, como indicado por ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.

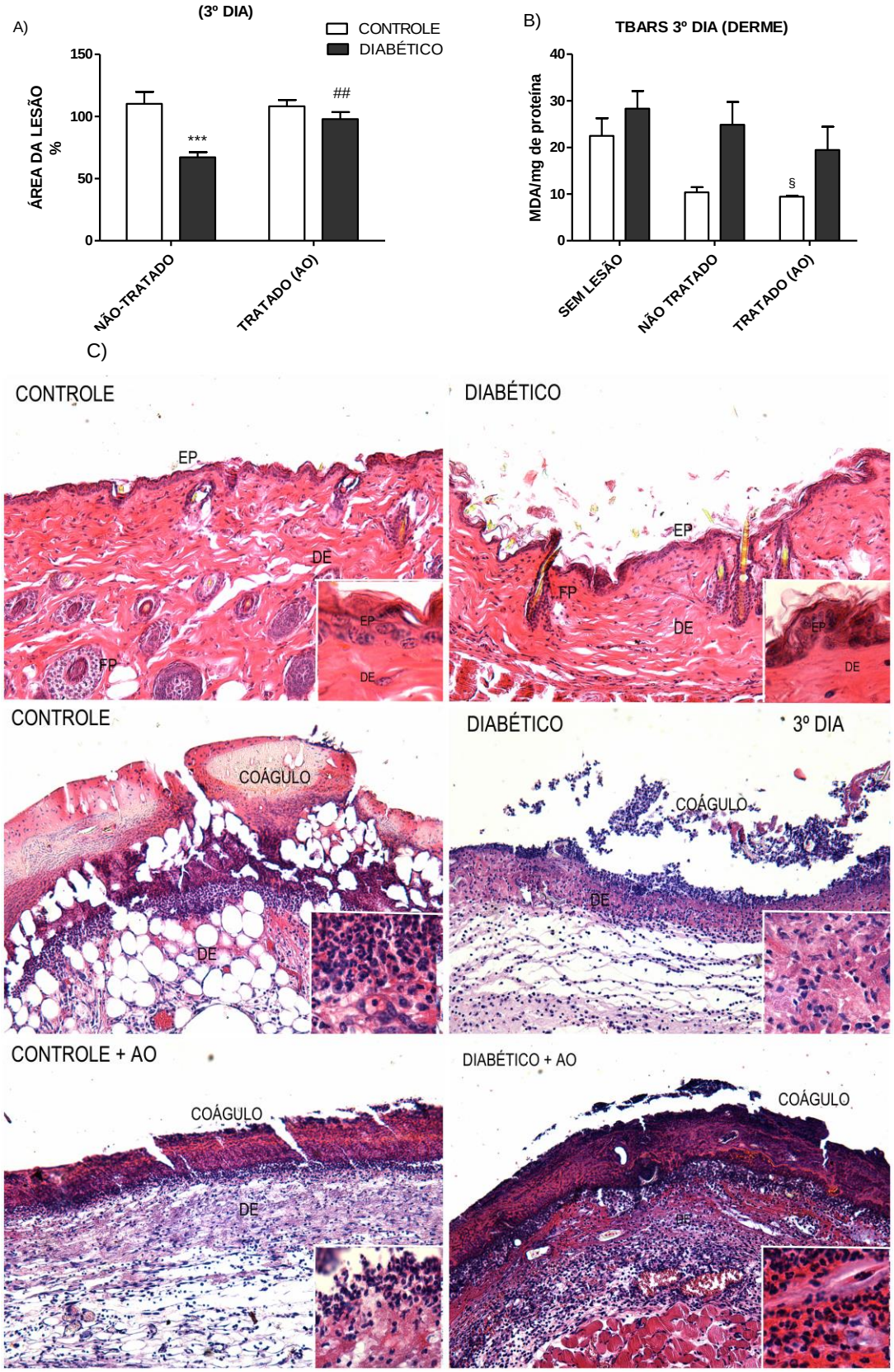
4.1.3 Efeitos do tratamento sistêmico com vitaminas antioxidantes sobre o processo cicatricial no 3º dia pós - lesão

A análise morfométrica do fechamento da lesão no 3º dia, fase de intensa inflamação na ferida, mostrou que nos animais controle não tratados houve ligeiro aumento da área da ferida, provavelmente devido ao edema (Figura 16 - A). Os animais diabéticos não tratados apresentaram redução da área. O tratamento com vitaminas não afetou a área no grupo controle, mas aumentou a área da ferida nos diabéticos, tornando-os semelhantes aos grupos controle não tratado e tratado (Figura 16 - A).

O grau do estresse oxidativo foi avaliado pelo método TBARS; conforme mostrado na Figura 5B. Na derme sem lesão não foi observada diferença entre animais controle e diabéticos. No 3º dia pós - lesão, na derme remanescente, houve uma redução de TBARS nos animais controle, mas não nos diabéticos, o que gerou uma diferença entre estes dois grupos. O tratamento com antioxidantes por 3 dias alterou muito pouco este quadro (Figura16 - B).

Quanto à morfologia das feridas, no 3º dia as lesões apresentavam o coágulo com grande quantidade de restos celulares. Na derme dos animais controle observou-se grande quantidade de células inflamatórias e adipócitos, em contraste à derme dos animais diabéticos, com menor quantidade de células inflamatórias e poucos adipócitos. O tratamento não alterou significativamente o aspecto da ferida nos animais controle, mas elevou a quantidade de células inflamatórias nos diabéticos. (Figura16 - C).

Figura 16 - Parâmetros da ferida no 3º dia pós - lesão em camundongos controle e diabéticos não tratados e tratados com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C. A) Área da ferida avaliada por morfometria, com resultados expressos em porcentagem (%) em relação à área inicial. **B)** Quantificação de MDA pelo método TBARS, como parâmetro de estresse oxidativo na derme; resultados expressos por mg/proteína. **C)** Morfologia da lesão, coloração H&E; em destaque (retângulo menor), células presentes na derme. Objetivas 5 x e 100 x. Os valores nos gráficos são apresentados como média ± EPM de 12 - 30 animais por grupo. (***) $p < 0.001$, para diferenças significativas em relação ao controle não tratado, $p < 0.01$ para diferenças significativas em relação ao diabético não tratado, como indicado por ANOVA two - way e pós-teste de Bonferroni).


A)
(3º DIA)
CONTROLE
DIABÉTICO
ÁREA DA LESÃO %
150
100
50
0
***
##
NÃO-TRATADO
TRATADO (AO)
B)
TBARS 3º DIA (DERME)
MDA/mg de proteína
40
30
20
10
0
§
SEM LESÃO
NÃO TRATADO
TRATADO (AO)
C)
CONTROLE
EP
DE
FP
DIABÉTICO
EP
FP
DE
CONTROLE
COÁGULO
DE
DIABÉTICO
3º DIA
COÁGULO
DE
CONTROLE + AO
COÁGULO
DE
DIABÉTICO + AO
COÁGULO
DE

Quanto às citocinas inflamatórias analisadas (TNF - α, IL - 1β, IL - 12p40 e IL - 4), observou-se que na derme sem lesão não havia diferença significativa entre animais controle e diabéticos. No 3º dia pós - lesão houve um aumento significativo de TNF - α e IL - 1β na derme de animais controle, mas este aumento não foi observado na derme dos animais diabéticos. Observou-se, no grupo lesionado, uma expressão maior de IL - 12p40 nos animais controle, quando comparados aos diabéticos (Figura 17). O tratamento com antioxidantes não alterou as citocinas em animais controle, exceto por um pequeno aumento na IL - 4 (Figura - 17). Nos animais diabéticos, o tratamento restaurou os níveis de TNF - α e IL - 1β alterou a IL - 12p40 e elevou significativamente a IL - 4 (Figura -17).

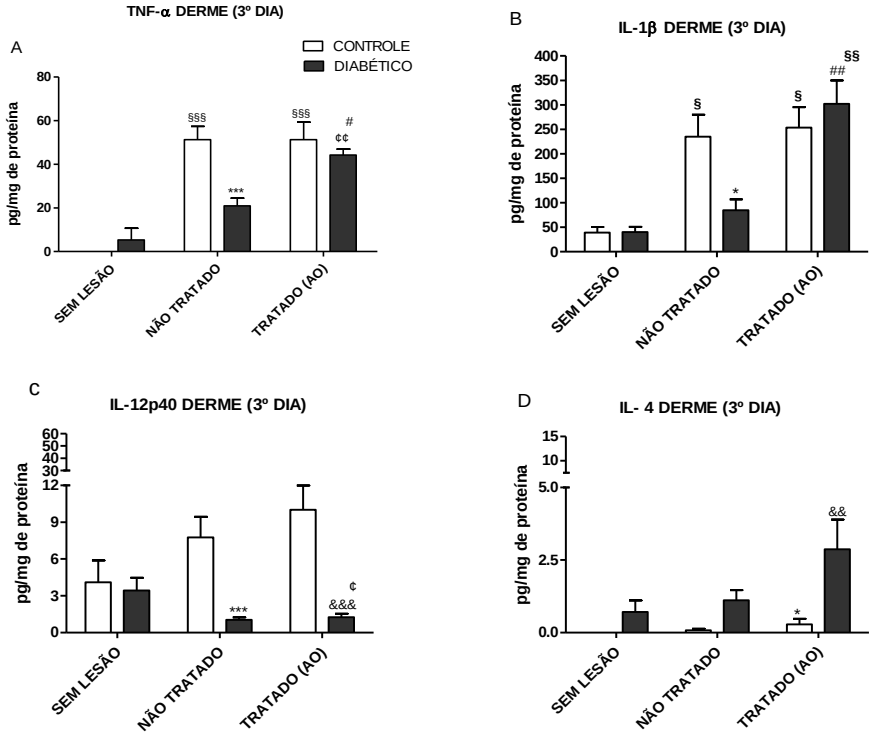
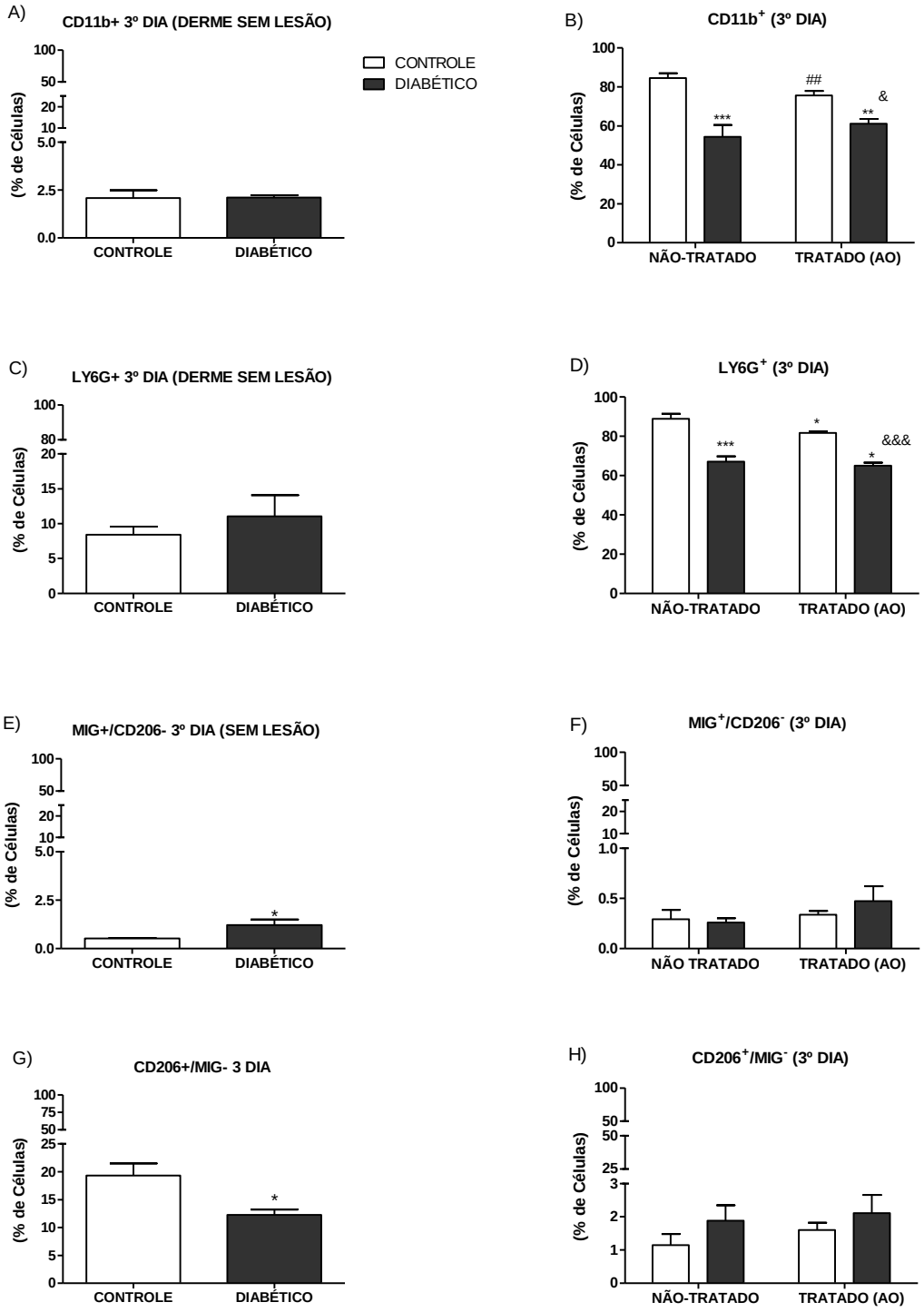


Figura 17 - Citocinas inflamatórias (A) TNF - α, (B) IL - 1β, (C) IL - 12p40 e (D) IL -4 na derme sem lesão e no 3º dia pós - lesão em camundongos controle e diabéticos, não tratados e tratados com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C. A dosagem foi feita por ELISA. Os valores são apresentados como média ± EPM (pg/mg de proteína) de 4-9 animais por grupo. (§) $p < 0.05$, (§§) $p < 0.01$, (§§§) $p < 0.001$para diferenças significativas em relação ao controle sem lesão e tratamento, (¢) $p < 0.05$, (¢¢) $p < 0.01$ para diferenças significativas em relação ao diabético sem lesão e tratamento, (*) $p < 0.05$, (***) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle não tratado, (#) $p < 0.05$, (##) $p < 0.01$, para diferenças significativas em relação ao diabético não tratado, (&&) $p < 0.01$ para diferenças significativas em relação ao controle tratado (AO), como indicado por ANOVA two-way e pós-teste de Bonferroni.

Para análise da população de células inflamatórias foi avaliada, por FACS, a presença de células $CD11^+$, $LY6G^+$, $MIG^+/CD206^-$ e $CD206^+/MIG^-$, representando granulócitos, neutrófilos, macrófagos com perfil M1 e com perfil M2, respectivamente. Na derme sem lesão não houve diferença na frequência de células $CD11^+$ e $LY6G^+$ entre animais controle e diabéticos. Animais diabéticos, no entanto, apresentaram mais células $MIG^+/CD206^-$ (macrófagos perfil M1) e menos células $CD206^+/MIG^-$ (macrófagos perfil M2), quando comparados aos animais controle (Figura - 18).

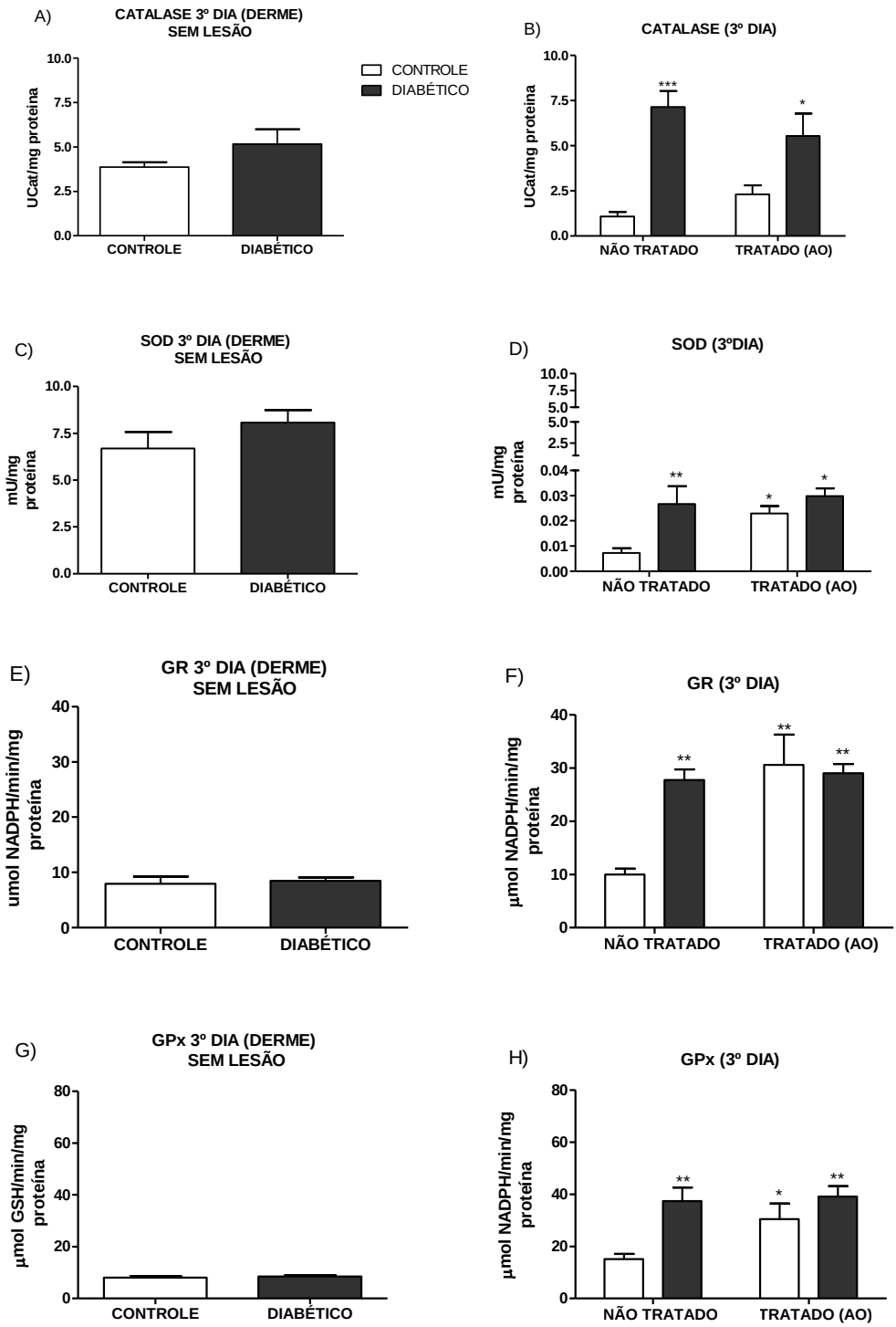
Em comparação à derme sem lesão, na pele lesionada de animais controle houve aumento da frequência de células $CD11^+$, $LY6G^+$ e $MIG^+/CD206^-$, concomitante à redução de células $CD206^+/MIG^-$. Nos animais diabéticos este aumento foi menor para $CD11b^+$ e $Ly6G^+$, enquanto as células $MIG^+/CD206^-$ e $CD206^+/MIG^-$ permaneceram semelhantes ao grupo controle (Figura 18 -). O tratamento com vitaminas antioxidantes manteve a diferença existente entre animais controle e diabéticos, mas reduziu ligeiramente a frequência de células $CD11^+$ e $LY6G^+$ na derme dos animais controle (Figura 18 -).

Figura 18 - Frequência de leucócitos CD11b^{+}, Ly6G^{+}, MIG^{+}/CD206^{-} e CD206^{+}/MIG^{-} na derme sem lesão e no 3º dia pós - lesão em camundongos controle e diabéticos, não tratados e tratados com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C. Os leucócitos foram analisados por citometria de fluxo (FACS). Os valores estão apresentados como média ± EPM (% de células) de 3 - 9 animais por grupo. (§) $p < 0.05$ para diferença significativa em relação ao controle sem lesão e tratamento, (*) $p < 0.05$, (***) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle não tratado, (##) $p < 0.01$ para diferenças significativas em relação ao diabético não tratado, (&) $p < 0.05$, (&&&) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle tratado, como indicado por ANOVA two-way e pós-teste de Bonferroni.


A)
CD11b+ 3º DIA (DERME SEM LESÃO)
CONTROLE
DIABÉTICO
(% de Células)
CONTROLE
DIABÉTICO
B)
CD11b+ (3º DIA)
(% de Células)
NÃO-TRATADO
TRATADO (AO)
C)
LY6G+ 3º DIA (DERME SEM LESÃO)
(% de Células)
CONTROLE
DIABÉTICO
D)
LY6G+ (3º DIA)
(% de Células)
NÃO-TRATADO
TRATADO (AO)
E)
MIG+/CD206- 3º DIA (SEM LESÃO)
(% de Células)
CONTROLE
DIABÉTICO
F)
MIG+/CD206- (3º DIA)
(% de Células)
NÃO TRATADO
TRATADO (AO)
G)
CD206+/MIG- 3 DIA
(% de Células)
CONTROLE
DIABÉTICO
H)
CD206+/MIG- (3º DIA)
(% de Células)
NÃO-TRATADO
TRATADO (AO)

A atividade das enzimas antioxidantes GR (Glutationa Redutase), GPx (Glutationa Peroxidase), SOD (Superóxido Dismutase) e Catalase foi avaliada por reação de cinética enzimática. Na derme sem lesão não foi observada diferença entre animais controle e diabéticos (Figura 19 -). A lesão reduziu as atividades das enzimas catalase e SOD em animais controle, enquanto a atividade das outras enzimas não foi alterada. Em animais diabéticos com lesão, a atividade de todas as enzimas avaliadas estava significativamente aumentada em comparação aos respectivos controles (com lesão). O tratamento com antioxidantes não aumentou a atividade das enzimas no grupo diabético com lesão, mas um aumento de SOD, GR e GPx foi observado no grupo controle (Figura 19 -).

Figura 19 - Atividade das enzimas antioxidantes Catalase (A - B), Superóxido Dismutase (SOD, C - D), Glutationa Redutase (GR, E - F) e Glutationa Peroxidase (GPx, G - H), na derme sem lesão e no 3º dia pós - lesão em camundongos controle e diabéticos, tratados ou não com vitaminas antioxidantes (AO), **nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C. A** atividade das enzimas foi avaliada por cinética enzimática e os resultados são apresentados como média ± EPM de 3 - 7 animais por grupo. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle não tratado, como indicado por ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.


A)
CATALASE 3º DIA (DERME)
SEM LESÃO
UCat/mg proteína
CONTROLE
DIABÉTICO
B)
CATALASE (3º DIA)
UCat/mg proteína
NÃO TRATADO
TRATADO (AO)
C)
SOD 3º DIA (DERME)
SEM LESÃO
mU/mg proteína
D)
SOD (3ºDIA)
mU/mg proteína
E)
GR 3º DIA (DERME)
SEM LESÃO
umol NADPH/min/mg proteína
F)
GR (3º DIA)
µmol NADPH/min/mg proteína
G)
GPx 3º DIA (DERME)
SEM LESÃO
µmol GSH/min/mg proteína
H)
GPx (3º DIA)
µmol NADPH/min/mg proteína

A concentração de hidroperóxido lipídico (LPO) na derme sem lesão foi muito baixa, tanto no grupo controle quanto no diabético (Figura 20). A lesão aumentou esta concentração, principalmente nos animais controle; a diferença entre controles e diabéticos tornou - se muito significativa na derme lesionada. O tratamento com antioxidantes não alterou este perfil (Figura 20 -).

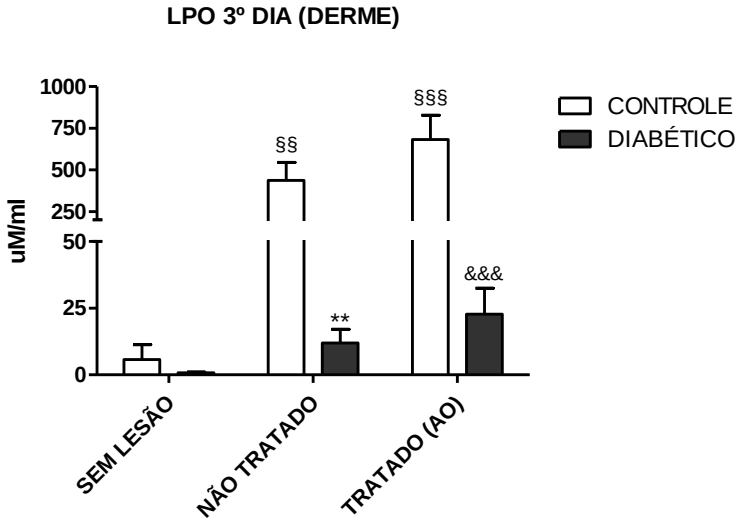


Figura 20 - Hidroperóxido Lipídico (LPO) na derme sem lesão e no 3º dia pós - lesão, em animais controles e diabéticos, tratados ou não com vitaminas antioxidantes (AO), **nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C.** Os valores são apresentados como média ± EPM de 3 - 5 animais por grupo. (§§) $p < 0.01$, (§§§) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle sem lesão, (**) $p < 0.01$ para diferença significativa em relação ao controle não tratado, (&&&) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao controle tratado, conforme ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.

4.1.4 Efeitos do tratamento sistêmico com vitaminas antioxidantes sobre o processo cicatricial no 14º dia pós-lesão

No 14º dia pós - lesão, fase de reparo tecidual tardio, observamos a reorganização da MEC e reepitelização com total fechamento da ferida nos animais controle. Animais diabéticos apresentavam um retardo no fechamento da ferida, persistência de grande quantidade de células inflamatórias na derme, MEC desorganizada e atraso na reepitelização (Figura 21 - A, C). O tratamento com antioxidantes reverteu estas diferenças observadas entre animais controle e diabéticos (Figura 21 - A, C).

Conforme já observado anteriormente, na pele sem lesão não houve diferença na quantidade de malondialdeído (MDA, um indicador de estresse oxidativo) entre animais controle e diabéticos. Houve um aumento de MDA na pele lesionada em animais diabéticos, enquanto os controles não sofreram alteração. O tratamento com vitaminas antioxidantes durante 14 dias preveniu este aumento nos diabéticos, sugerindo efetividade de ação (Figura 21 - B).

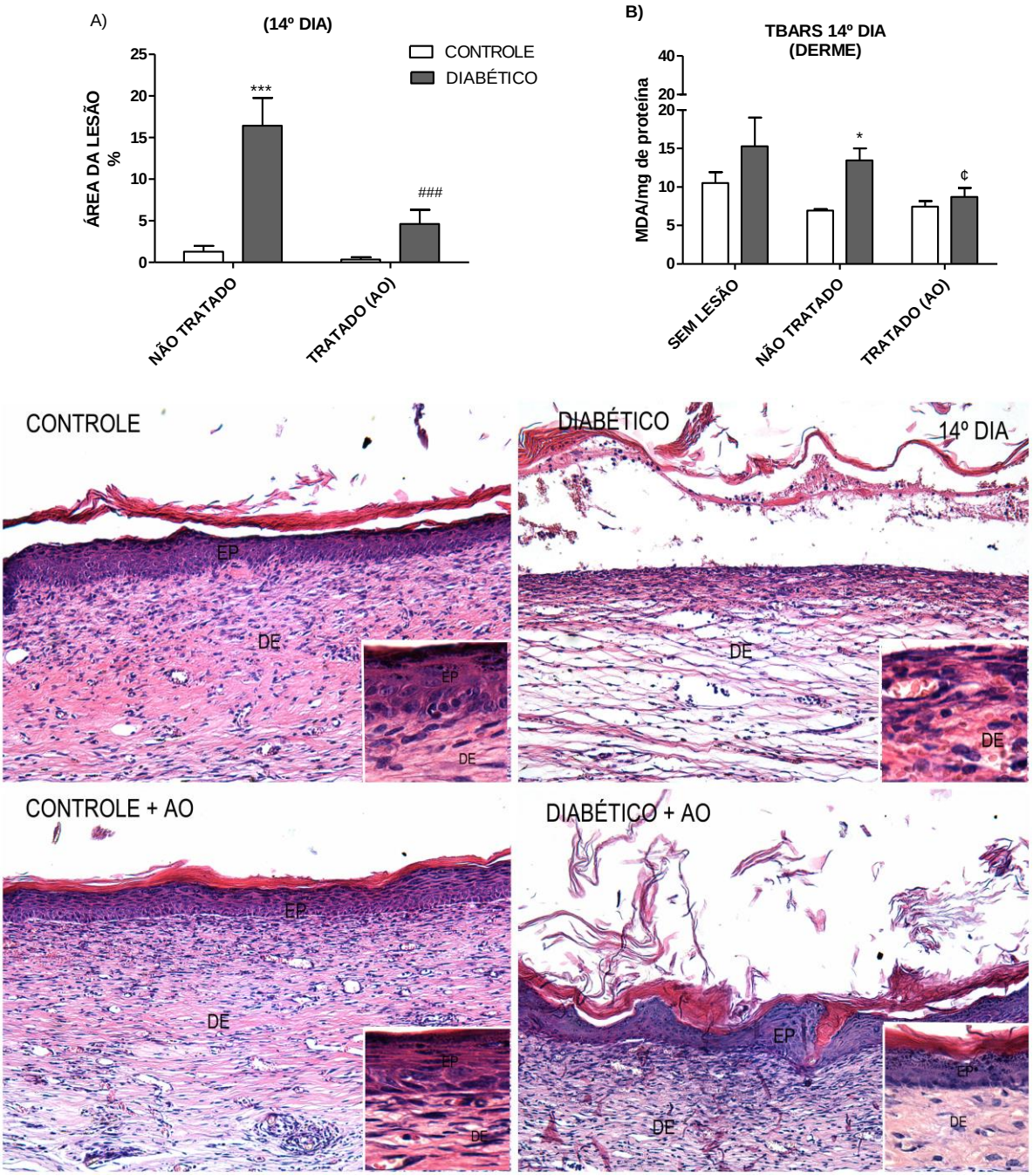


Figura 21 - Parâmetros da ferida no 14º dia pós - lesão em camundongos controle e diabéticos não tratados e tratados com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C. A) Área da ferida avaliada por morfometria, com resultados expressos em porcentagem (%) em relação à área inicial. **B)** Quantificação de malondialdeído (MDA) pelo método TBARS, como parâmetro de estresse oxidativo na derme; resultados expressos por mg/proteína. **C)** Morfologia da lesão, coloração H&E; em destaque (retângulo menor), células presentes na derme. Objetivas 5 x e 100 x. Os valores nos gráficos são apresentados como média ± EPM de 12 - 30 animais por grupo. (***) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao controle não tratado, (###) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao diabético não tratado, como indicado por ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.

Quanto às citocinas inflamatórias (TNF- α, IL - 1β, KC, IL - 12p40 e IL - 4), conforme observação anterior, na derme sem lesão não havia diferença significativa entre animais controle e diabéticos. No 14º dia pós - lesão, em animais controle, as citocinas apresentavam níveis semelhantes àqueles da derme sem lesão, exceto pela IL - 12p40, que estava significativamente aumentada (Figura 22 -). Nos animais diabéticos as citocinas TNF - α, IL - 1β e IL - 4 estavam mais elevadas que no grupo controle, sugerindo persistência da reação inflamatória. Já a IL - 12p40 encontrava-se reduzida em comparação ao respectivo controle com lesão (Figura 22 -). O tratamento com antioxidantes não alterou as citocinas em animais controle, enquanto nos animais diabéticos reduziu (restaurou) os níveis de TNF - α, IL - 1β, IL - 4, não alterando a IL - 12p40 (Figura 22 -).

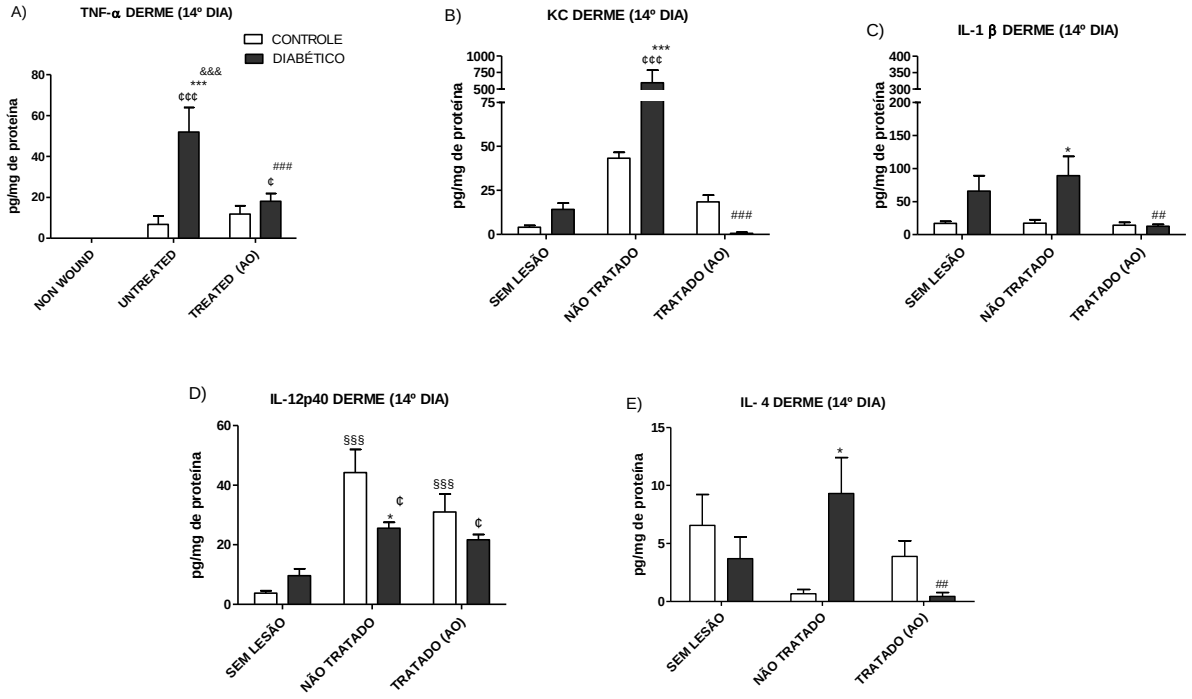


Figura 22 - Citocinas inflamatórias TNF - α (A), KC (B), IL - 1β (C), IL - 12p40 (D) e IL - 4 (E) na derme sem lesão e no 14º dia pós - lesão em camundongos controles e diabéticos, não tratados e tratados com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C. A dosagem foi feita por ELISA**.** Os valores são apresentados como média ± EPM (pg/mg de proteína) de 3 - 9 animais por grupo. (§) $p < 0.05$, (§§§) $p < 0.001$para diferenças significativas em relação ao controle sem lesão e tratamento, (¢) $p < 0.05$, (¢¢¢) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao diabético sem lesão e tratamento, (*) $p < 0.05$, (***) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle não tratado, (#) $p < 0.05$, (##) $p < 0.01$, (###) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao diabético não tratado, (&&&) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao controle tratado (AO), como indicado por ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.

Nesta fase da cicatrização foi possível a análise da epiderme, já que havia reepitelização. Diferentemente da derme, na epiderme sem lesão foram observadas diferenças entre animais controle e diabéticos: os diabéticos apresentavam níveis mais elevados de KC, TNF - α e IL - 12p40, níveis reduzidos de IL - 4 e inalterados de IL - 1β (Figura 23 -). Na epiderme durante reepitelização (14° dia), TNF - α, KC e IL - 1β não se alteraram nos animais controle, enquanto IL - 12p40 e IL - 4 estavam reduzidas em comparação aos animais controle sem lesão. Nos diabéticos, de maneira geral, os níveis de citocinas estavam menores que nos animais sem lesão e semelhantes aos grupos controle com lesão. O tratamento com antioxidantes praticamente não alterou este perfil, quando comparado aos animais com lesão, mas sem o tratamento (Figura 23 -).

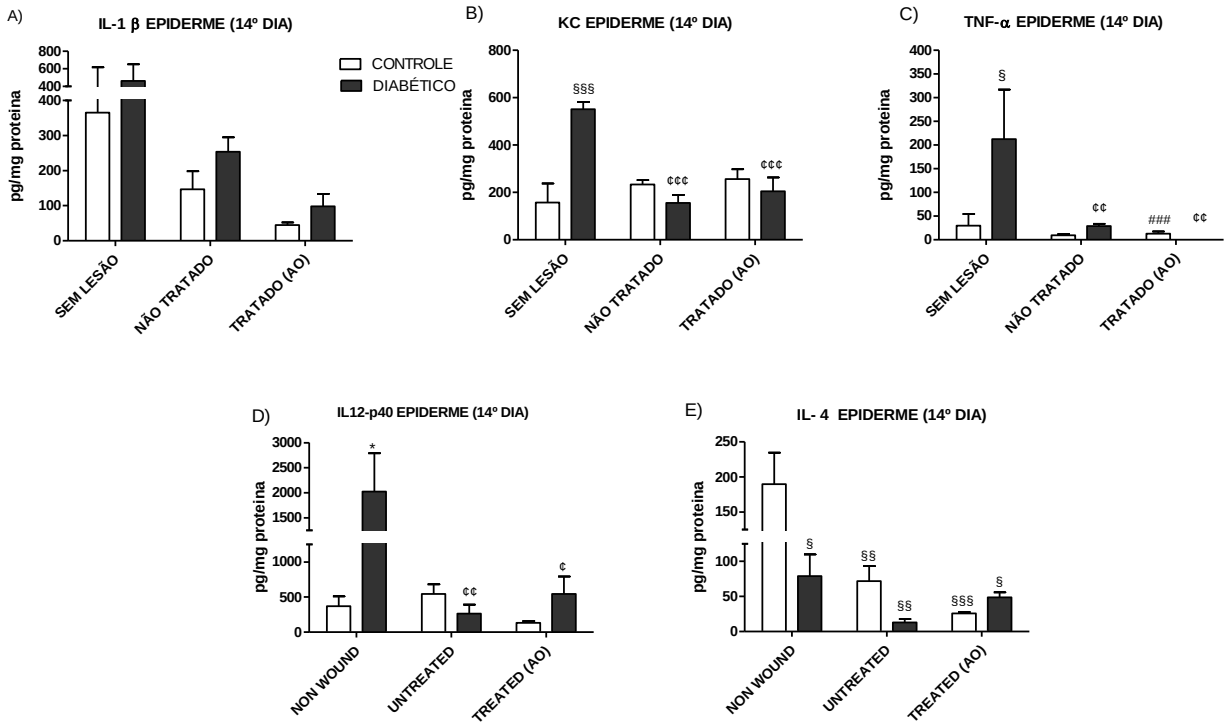
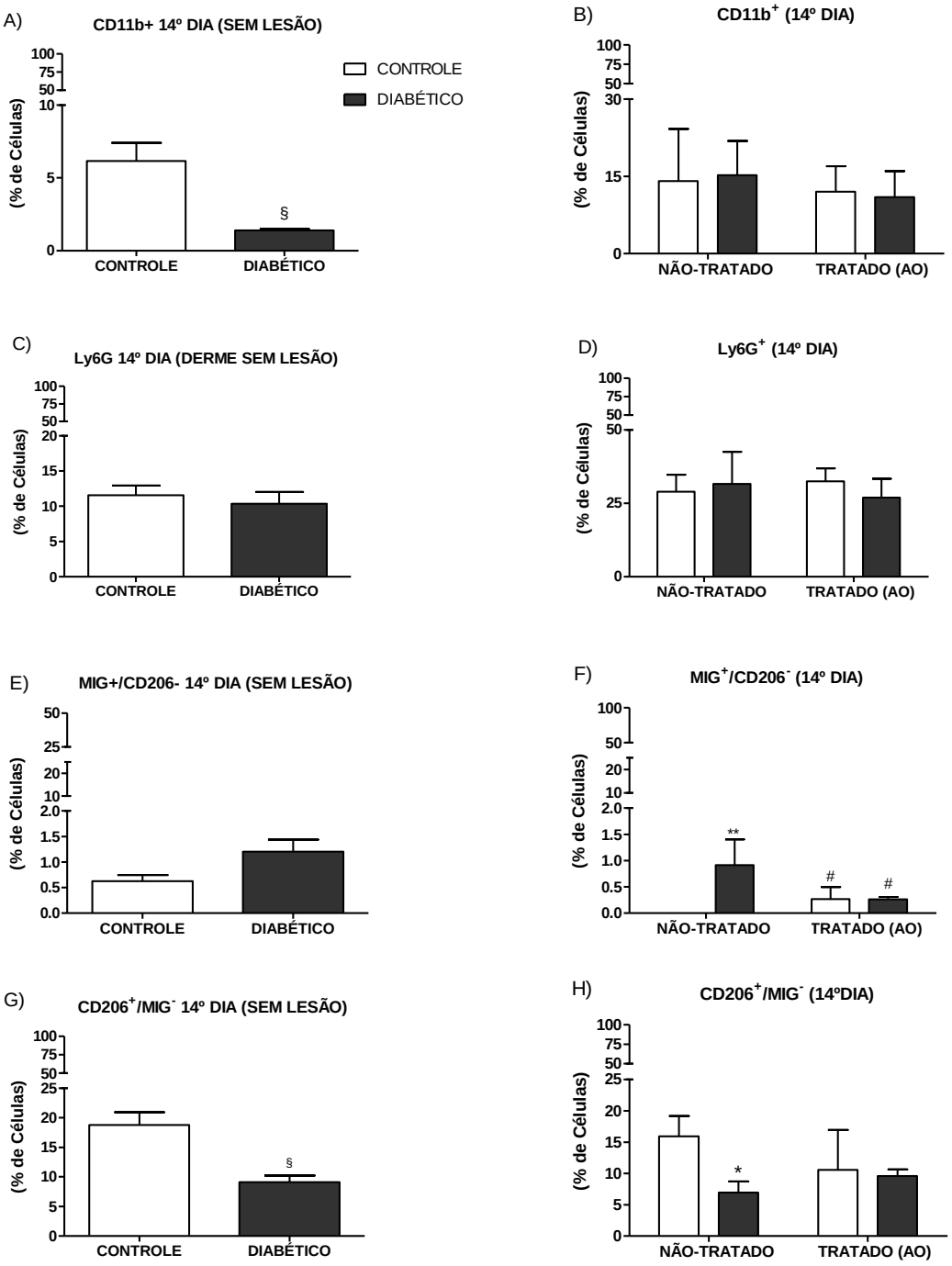


Figura 23 - Citocinas inflamatórias TNF - α (A), KC (B), IL - 1β (C), IL - 12p40 (D) e IL - 4 (E) na epiderme sem lesão e no 14° dia pós - lesão em camundongos controle e diabéticos, não tratados e tratados com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C. A dosagem foi feita por ELISA. Os valores são apresentados como média ± EPM (pg/mg de proteína) de 3 - 9 animais por grupo. (§) $p < 0.05$, (§§§) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle sem lesão; (¢) $p < 0.05$, (¢¢¢) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao diabético sem lesão; (*) $p < 0.05$, (***) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle não tratado, (#) $p<0.05$, (##) $p < 0.01$, (###) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao diabético não tratado, (&&&) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao controle tratado (AO), conforme ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.

Análise da população de células inflamatórias foi novamente avaliada por FACS para os antígenos CD11, LY6G, MIG e CD206, representando respectivamente granulócitos, neutrófilos, macrófagos com perfil M1 e com perfil M2. Na derme sem lesão a quantidade de granulócitos (mas não de neutrófilos) e macrófagos M2 mostrou - se menor em diabéticos, comparando-se aos animais controle. Não houve diferença na frequência de macrófagos M1 entre animais controle e diabéticos (Figura 24 -).

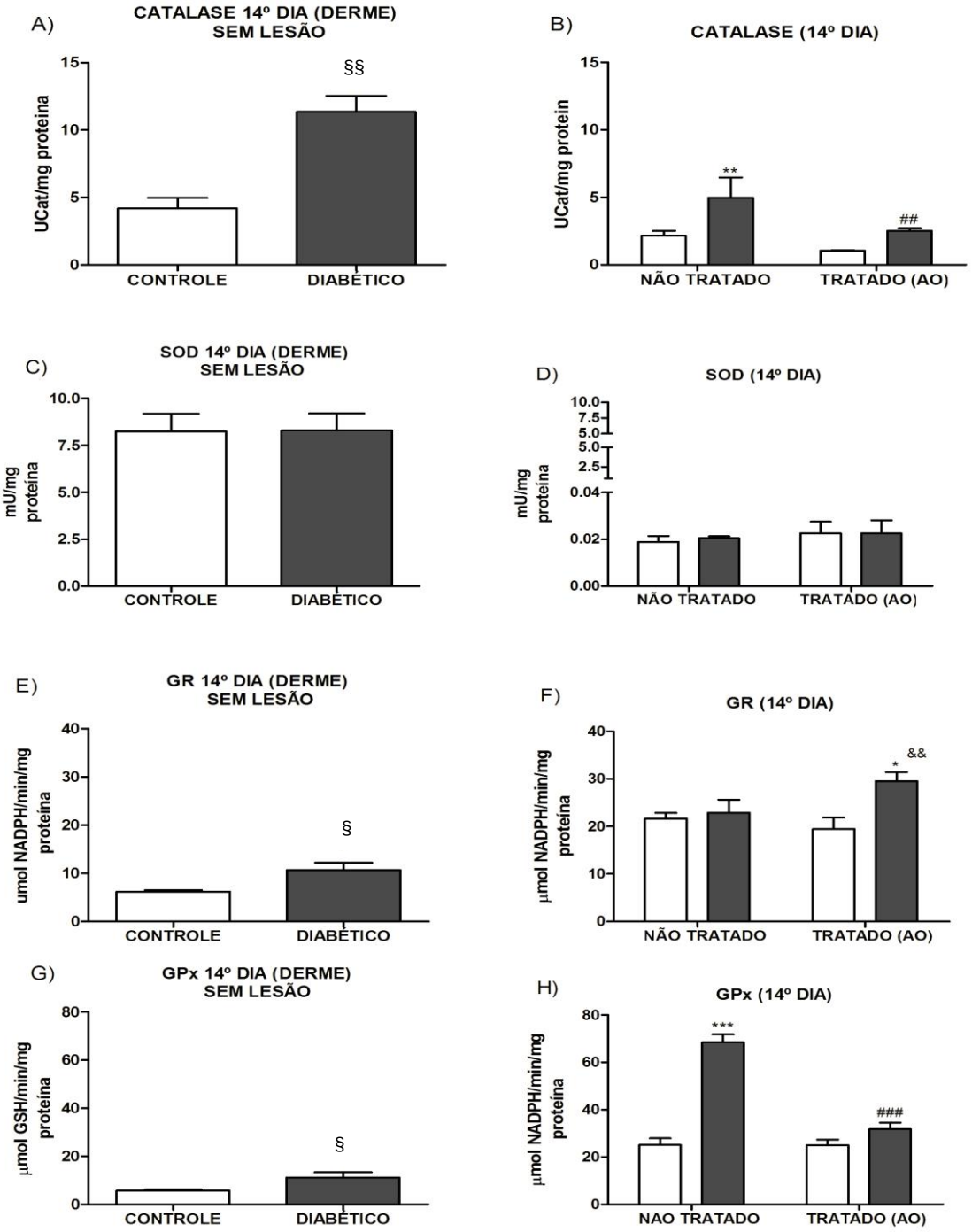
Os resultados obtidos na derme lesionada foram semelhantes aos observados na derme sem lesão, tanto em animais controle quanto em animais diabéticos, exceto pelos granulócitos ($CD11b^{+}$), que encontravam-se semelhantes nos dois grupos. O tratamento com vitaminas antioxidantes alterou muito pouco este perfil, aparentemente reduzindo macrófagos M1 e aumentando ligeiramente macrófagos M2 (Figura 24 -).

Figura 24 - Frequência de leucócitos CD11b^{+}, Ly6G^{+}, MIG^{+}/CD206^{-} e CD206^{+}/MIG^{-} na derme sem lesão e no 14º dia pós - lesão em camundongos controles e diabéticos, não tratados e tratados com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C. Os leucócitos foram analisados por citometria de fluxo (FACS). Os valores estão apresentados como média ± EPM (% de células) de 3 - 7 animais por grupo**:** (§) $p < 0.05$ para diferença significativa em relação ao controle sem lesão; (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ para diferenças significativas em relação ao controle não tratado, (#) $p < 0.05$ para diferença significativa em relação ao diabético não tratado, conforme ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.


A)
CD11b+ 14º DIA (SEM LESÃO)
CONTROLE
DIABÉTICO
(% de Células)
§
CONTROLE
DIABÉTICO
B)
CD11b+ (14º DIA)
(% de Células)
NÃO-TRATADO
TRATADO (AO)
C)
Ly6G 14º DIA (DERME SEM LESÃO)
(% de Células)
CONTROLE
DIABÉTICO
D)
Ly6G+ (14º DIA)
(% de Células)
NÃO-TRATADO
TRATADO (AO)
E)
MIG+/CD206- 14º DIA (SEM LESÃO)
(% de Células)
CONTROLE
DIABÉTICO
F)
MIG+/CD206- (14º DIA)
(% de Células)
**
#
#
NÃO-TRATADO
TRATADO (AO)
G)
CD206+/MIG- 14º DIA (SEM LESÃO)
(% de Células)
§
CONTROLE
DIABÉTICO
H)
CD206+/MIG- (14ºDIA)
(% de Células)
*
NÃO-TRATADO
TRATADO (AO)

A atividade das enzimas antioxidantes GR (Glutationa Redutase), GPx (Glutationa Peroxidase), SOD (Superóxido Dismutase) e Catalase foi novamente avaliada por reação de cinética enzimática. Na derme sem lesão observou-se maior atividade da catalase, GR e GPx em animais diabéticos, enquanto SOD apresentava atividade semelhante entre os grupos (Figura 25 -). A lesão reduziu a atividade da enzima SOD e aumentou as atividades de GR e GPx em animais controle (Figura 25 -). O aumento de GPx foi ainda mais pronunciado nos animais diabéticos com lesão (Figura 25 -). A diferença da atividade da catalase observada entre os grupos na pele sem lesão manteve-se na derme lesionada. O tratamento com antioxidantes alterou o perfil enzimático em comparação à derme lesionada sem tratamento, com redução da atividade de GPx nos animais diabéticos (tornando-os semelhantes aos animais controle neste parâmetro) e um pequeno aumento da atividade de GR (Figura 25 -).

Figura 25 - Atividade das enzimas antioxidantes Catalase (A - B), Superóxido Dismutase (SOD, C - D), Glutationa Redutase (GR, E - F) e Glutationa Peroxidase (GPx, G - H), na derme sem lesão e no 14º dia pós - lesão em camundongos controles e diabéticos, tratados ou não com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C. A atividade das enzimas foi avaliada por cinética enzimática e os resultados são apresentados como média ± EPM de 3 - 7 animais por grupo. (§) $p < 0.05$, (§§) $p < 0.01$ para diferenças significativas em relação ao controle sem lesão; (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ e (***) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle não tratado, (#) $p < 0.05$, (##) $p < 0.01$ para diferenças significativas em relação ao diabético não tratado, conforme ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.


A)
CATALASE 14º DIA (DERME)
SEM LESÃO
UCat/mg proteina
§§
CONTROLE
DIABÉTICO
B)
CATALASE (14º DIA)
UCat/mg protein
**
##
NÃO TRATADO
TRATADO (AO)
C)
SOD 14º DIA (DERME)
SEM LESÃO
mU/mg proteina
CONTROLE
DIABÉTICO
D)
SOD (14º DIA)
mU/mg proteina
NÃO TRATADO
TRATADO (AO)
E)
GR 14º DIA (DERME)
SEM LESÃO
umol NADPH/min/mg proteina
§
CONTROLE
DIABÉTICO
F)
GR (14º DIA)
µmol NADPH/min/mg proteina
*
&&
NÃO TRATADO
TRATADO (AO)
G)
GPx 14º DIA (DERME)
SEM LESÃO
µmol GSH/min/mg proteina
§
CONTROLE
DIABÉTICO
H)
GPx (14º DIA)
µmol NADPH/min/mg proteina
***
###
NAO TRATADO
TRATADO (AO)

A concentração de hidroperóxido lipídico (LPO) na derme sem lesão foi muito baixa, tanto no grupo controle quanto no diabético (Figura 26 -). A lesão aumentou esta concentração, principalmente nos animais controle; a diferença entre controles e diabéticos tornou-se significativa na derme lesionada. O tratamento com antioxidantes não alterou significativamente este perfil (Figura 26 -). Estes resultados foram semelhantes àqueles observados na lesão de 3 dias.

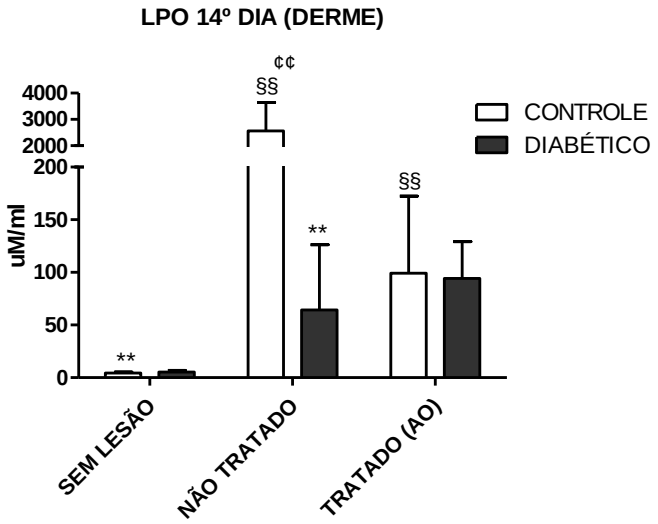


Figura 26 - Hidroperóxido Lipídico (LPO) na derme sem lesão e no 14º dia pós-lesão, em animais controles e diabéticos, tratados ou não com vitaminas antioxidantes (AO), nas concentrações de 40 mg/kg de vitamina E e 100 mg/kg de vitamina C. Os valores são apresentados como média ± EPM de 3 - 7 animais por grupo. (§§) $p < 0.01$ para diferença significativa em relação ao controle sem lesão; (¢¢) $p < 0.01$ para diferença significativa em relação ao diabético sem lesão; (**) $p < 0.01$para diferença significativa em relação ao controle não tratado, conforme ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.

4.2 Parte II - Padronização Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs)

4.2.1 Desenvolvimento das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs)

As NLSs foram preparadas com duas diferentes concentrações de vitamina E, e na ausência da mesma. As análises foram realizadas por difratometria de laser com o intuito de verificar a presença de apenas uma população nanométrica. Todas as formulações apresentaram-se brancas amareladas com uma faixa de diâmetro. Valores de diâmetros das formulações são apresentados na Tabela - 3 e Figura - 27.

NLSs	*D[4,3] µm*	*D(0,1) µm*	*D(0,5) µm*	*D(0,9) µm*	*Span*
NLS - Branco (dia zero)	0,133 ± 0,01	0,072 ± 0,005	0,114 ± 0,01	0,183 ± 0,03	0,973 ± 0,24
NLS - Branco (30 dias)	0,129 ± 0,011	0,074 ± 0,005	0,119 ± 0,005	0,194 ± 0,027	1,000 ± 0,227
NLS - 1%VITE (dia zero)	0,132 ± 0,003	0,075 ± 0,006	0,124 ± 0,001	0,202 ± 0,015	1,019 ± 0,163
NLS -1%VITE (30 dias)	0,134 ± 0,005	0,072 ± 0,006	0,125 ± 0,002	0,210 ± 0,019	1,101 ± 0,175
NLS - 2,5%VITE (dia zero)	0,135 ± 0,001	0,073 ± 0,002	0,127 ± 0,001	0,2113 ± 0,005	1,082 ± 0,047
NLS - 2,5%VITE (30 dias)	0,128 ± 0,011	0,073 ± 0,002	0,125 ± 0,001	0,209 ± 0,005	1,088 ± 0,005

Tabela 3- Distribuição granulométrica das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs). Preparado sem (branco) e com Vitamina E (1% e 2,5%) no dia do preparo (dia zero) e após 30 dias. NLSs - Branco (NB); NLSs –Vitamina E 1% (NANO VITE 1%); NLSs – Vitamina E 2,5% (NANO VITE 2,5%). Valores representam a média ± SD de três lotes para cada formulação.

A)

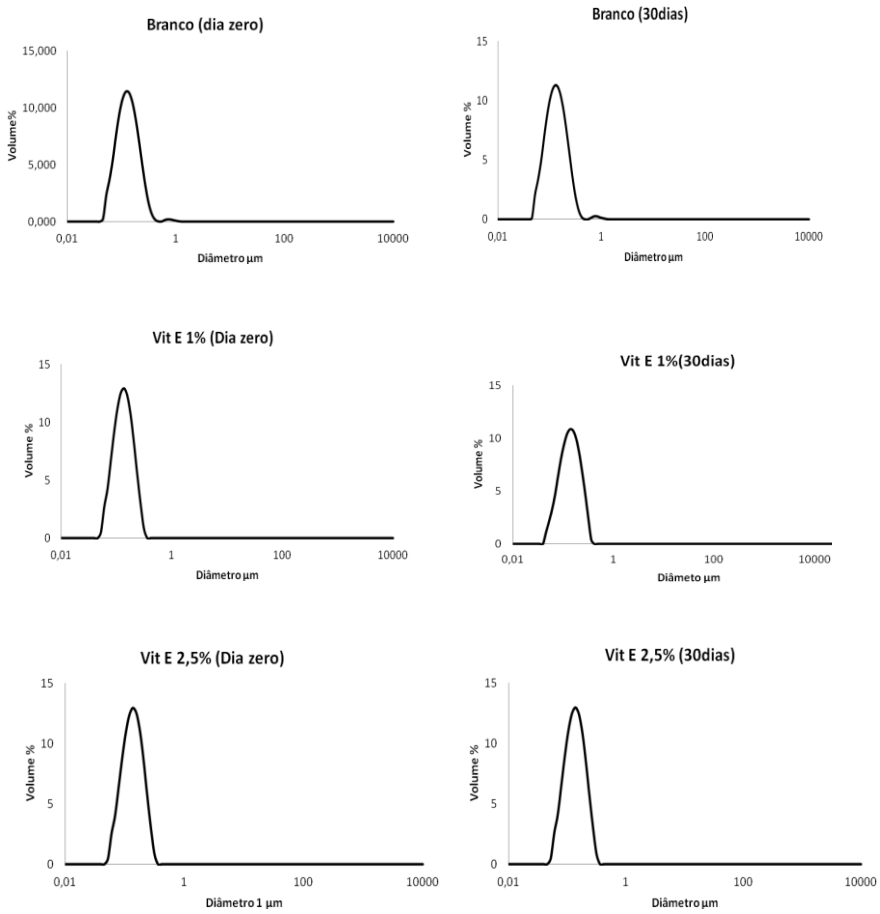


Figura 27 - Representação gráfica da distribuição granulométrica das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) no dia do preparo (dia zero) e após 30 dias. A confecção das nanopartículas feita em triplicata: A) NLS - Branco (NB); B) NLS –Vitamina E 1% (NANO VITE 1%); C) NLS –Vitamina E 2,5% (NANO VITE 2,5%).

Podemos observar somente picos nanométricos em todas as formulações (Figura 27 -).

Os resultados da Tabela 3 demonstram a estabilidade das formulações por 30 dias devido a apresentarem uma distribuição nanométrica de diâmetro durante todo o período.

A medida do teor de vitamina E nas nanopartículas permitiu avaliar a recuperação de 101,5 ± 3,52 µg/ml para concentração final de 1 µg/ml (1%) e de 106,1 ± 2,79 µg/ml para 2,5 µg/ml (2,5%) da vitamina E, o que confirma que não há perda na quantidade de vitamina E adicionada na formulação durante o processo de preparo.

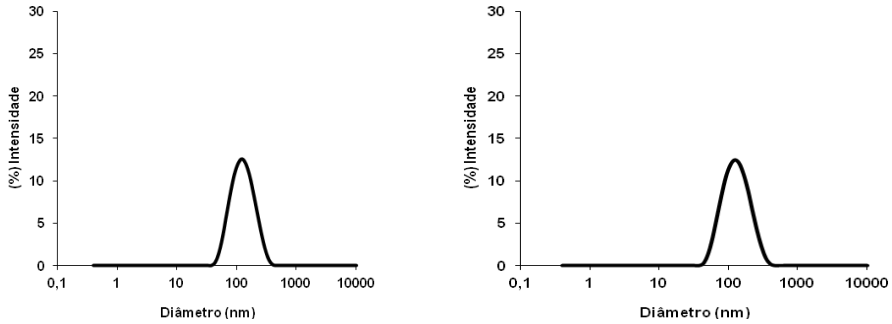
A avaliação da eficiência de encapsulação da vitamina E, foi de 100%, pois o ultrafiltrado obtido, quando analisado no CLAE não apresentou nenhum pico da mesma nas duas concentrações, 1% e 2,5% avaliadas.

A distribuição de diâmetro e polidispersão para as nanopartículas foram realizadas por espalhamento de luz dinâmico (Figura 28 -), a temperatura de 25 ºC, apresentando apenas uma população nanométrica. Os valores do diâmetro médio e o índice de polidispersão das nanopartículas no dia do preparo (dia zero) e após 30 dias podem ser observados na Tabela 4. As nanopartículas lipídicas se mostram estáveis após 30 dias.

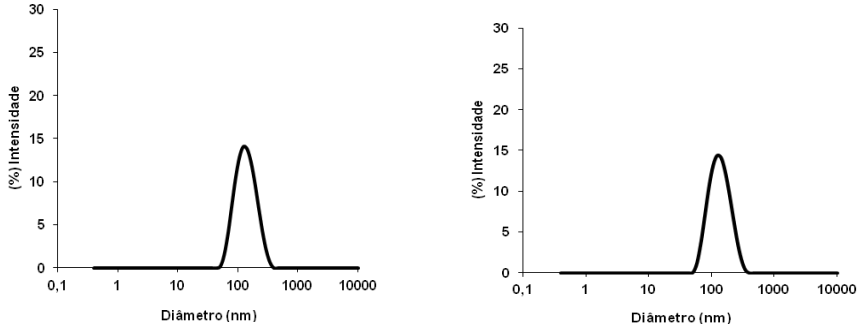
NLSs	*D (nm)*	*PDI*
NLS - Branco (dia zero)	105 ± 7,07	0,130 ± 0,019
NLS - Branco (30 dias)	119 ± 15,7	0,233 ± 0,056
NLS - 1%VITE (dia zero)	124 ± 1,37	0,121 ± 0,017
NLS - 1% VITE (30 dias)	137,32 ± 4,04	0,223 ± 0,037
NLS - 2,5% VITE (dia zero)	124 ± 0,246	0,102 ± 0,017
NLS - 2,5% VITE (30 dias)	141,08 ± 1,34	0,44 ± 0,246

Tabela 4 - A distribuição de diâmetro das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs). Os valores do diâmetro médio (D) e o índice de polidispersão (DPI) nos dias zero e 30º. NLS - Branco (NB); NLS – Vitamina E 1% (NANO VITE 1%); NLS – Vitamina E 2,5% (NANO VITE 2,5%). Valores em média ± SD.

A)



B)



C)

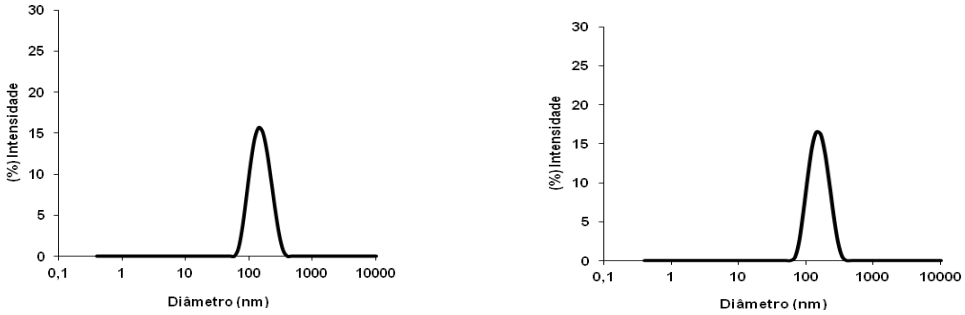
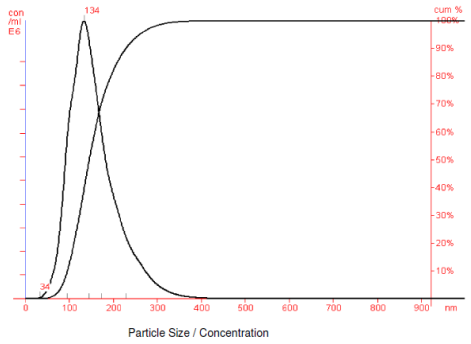


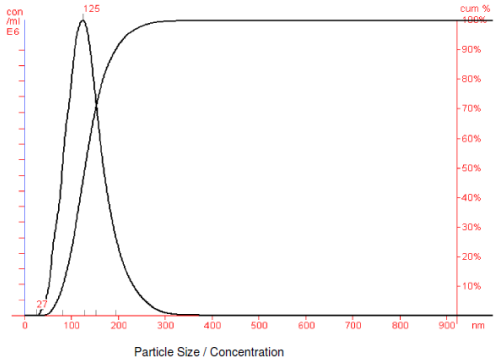
Figura 28 - Representação gráfica da distribuição de diâmetro das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) a temperatura de 25 ºC, no dia do preparo (dia zero) e no 30º dia. A) NLS - Branco (NB); B) NLS – Vitamina E 1% (NANO VITE 1%); C) NLS – Vitamina E 2,5% (NANO VITE 2,5%).

A partir destes resultados a análise de monitoramento das partículas foi realizada. A Figura 29 apresenta a distribuição de tamanho de partícula em função do número de partículas por ml na formulação e a porcentagem em relação diâmetro.

A)



B)



C)

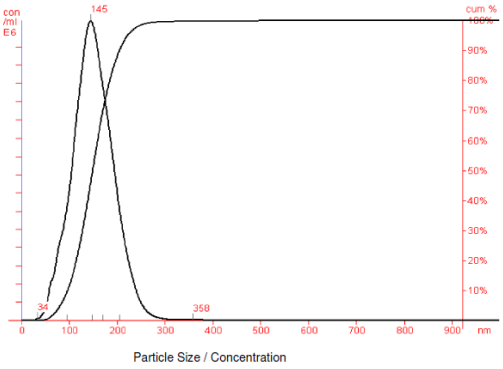


Figura 29 - Distribuição de tamanho da partícula em função do número de partículas das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs). **A)** NLS - Branco (NB); **B)** NLS – Vitamina E 1% (NANO VITE 1%); **C)** NLS – Vitamina E 2,5% (NANO VITE 2,5%).

Os valores de diâmetro médio apresentados por esta análise foram 155 ± 53 NLS - Branco (NB); 135 ± 45 para NLS – Vitamina E 1% (NANO VITE 1%) e 151 ± 42 para NLS – Vitamina E 2,5% (NANO VITE 2,5%). Valores em médias ± SD.

Análises de pH, condutividade e viscosidade foram realizadas para todas as nanopartículas (Tabela 5 -). O pH da pele varia entre 4,0 e 7,0. (Wilkinson, Moore, 1990) como podemos observar o pH da nanopartícula está dentro dos valores desejáveis para aplicação na região cutânea. Adicionalmente, a determinação do pH é muito útil no controle de qualidade pois a instabilidade química (*eg*. oxidação, hidrolise, entre outros) usualmente resulta em variações de pH (Gil, 2007) a manutenção do pH de uma formulação ao longo do tempo dá indícios de que está formulação apresenta estabilidade química.

Da mesma forma modificações nos componente iônicos dissolvidos na água iriam acarretar em alterações na condutividade, por este motivo esta técnica é utilizada para avaliar a presença de compostos orgânicos na água. A manutenção dos valores da condutividade indica que não ocorrem alterações químicas na formulação que possam afetar este parâmetro (*eg.* ionização). Sendo assim estes parâmetros serão acompanhados ao longo do tempo.

NLSs	pH (25 ºC)	Condutividade us/cm (25 ºC)	Viscosidade mPas (25 ºC)
NLS - Branco	6,04 ± 0,12	23,3 ± 2,1	1,30 ± 0,04
NLS - VITE (1%)	5,85 ± 0,02	24,9 ± 0,5	1,34 ± 0,009
NLS - VITE (2,5%)	5,97 ± 0,10	25,9 ± 1,4	1,39 ± 0,02

Tabela 5 - Valores das análises de pH, condutividade e viscosidade das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs). NLS - Branco (NB); NLS – Vitamina E 1% (NANOVITE 1%); NLS – Vitamina E 2,5% (NANO VITE 2,5%).Valores em médias ± SD.

A viscosidade de uma substância é a expressão da resistência ao fluxo quando submetida a uma tensão, quanto maior a viscosidade, maior a resistência (Martin et al., 1993). A viscosidade é um parâmetro físico-químico muito importante para a caracterização e controle de qualidade de líquidos e semi - sólidos. A viscosidade das suspensões foi muito próxima à da água, indicando que para a aplicação tópica a suspensão coloidal deveria ser espessada com um agente modificador de reologia, como o Carbopol® Ultrez (Tabela 5 -).

4.2.2 Resultados da Caracterização da Nanopartícula Lipídica no gel (G)

A distribuição de diâmetro das nanopartículas no gel foi avaliada pelos valores do diâmetro médio e o índice de polidispersão (Figura 30 -), sendo que os valores das nanopartículas permaneceram semelhantes após a incorporação no gel.

Ao analisarmos o diâmetro do gel, observamos um pequeno pico micrométrico devido ao tamanho do gel e o pico nanométrico devido ao tamanho da nanopartícula (Figura 30 -).

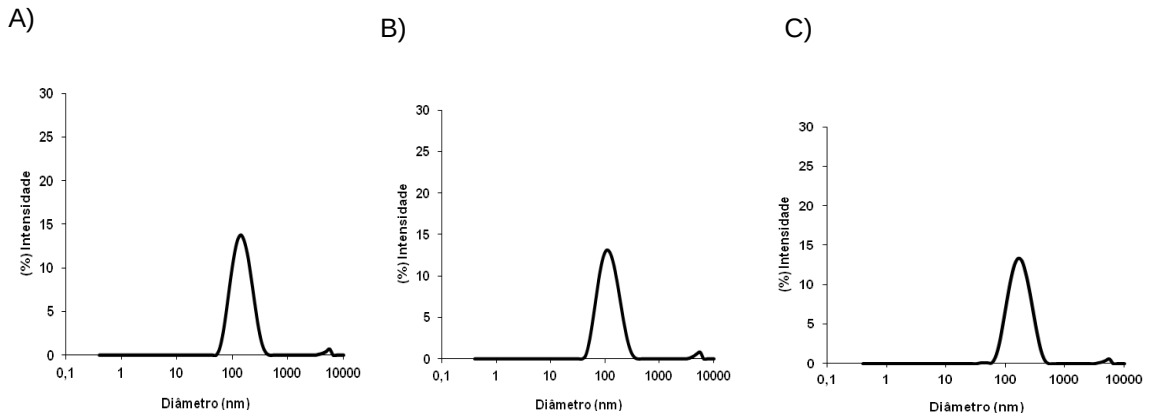


Figura 30 - Representação gráfica da distribuição do diâmetro das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) incorporadas ao gel, na temperatura de 25 ºC. **A)** NLS - Branco (NB); **B)** NLS – Vitamina E 1% (NANO VITE 1%); C) NLS – Vitamina E 2,5% (NANO VITE 2,5%).

A análise da viscosidade do gel em diferentes velocidades mostrou que não houve diferença entre as concentrações nas duas velocidades. Sendo assim, não haverá diferença na forma de liberação e absorção entre as concentrações analisadas.

NLS	Viscosidade	
	0,75 rpm (25 ºC)	3 rpm (25 ºC)
NLS - Branco	151.648 ± 29.662	87.390 ± 5.771
NLS-VITE (1%)	143.756 ± 16.811	76.784 ± 3.114
NLS- VITE (2,5%)	149.515 ± 14.511	85.475 ± 2.726

Tabela 6 - Viscosidade das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) incorporadas ao gel, nas velocidades de 0,75 rpm e 3 rpm a 25 ºC. NLS - Branco (NB); NLS – Vitamina E 1% (NANO VITE 1%); NLS – Vitamina E 2,5% (NANO VITE 2,5%). Valores em médias ± SD.

Com todas as análises realizadas, podemos concluir que a incorporação da vitamina E em sistema nanométrico, NLS, foi capaz gerar partículas de picos nanométricos; excelente capacidade de encapsulação do antioxidante; o que garante sua proteção contra agentes oxidantes externos e sua liberação lenta; características físico-químicas, pH, viscosidade condizentes a aplicação na pele; além de estáveis ao fator tempo. Sendo assim o sistema se apresenta eficiente para aplicação em nosso modelo experimental de ferida crônica diabética.

4.3 - Parte III: Aplicação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs)

4.3.1 Escolha da concentração de vitamina E

Para avaliarmos qual a melhor concentração a ser utilizada na aplicação tópica da nanopartícula de vitamina E, escolhemos duas concentrações 1 % e 2,5%, baseadas na literatura e na porcentagem de vitamina E contidas em formulações cosméticas. Assim, avaliamos a fase final da cicatrização, no 14º dia, por meio das analises morfometria, morfo - histológica e estresse oxidativo, pelo TBARS.

4.3.1.1 Morfometria

No 14º dia pós – lesão, observamos o atraso no fechamento da ferida no grupo diabético não tratado, em relação ao controle não tratado (Figura 31 - A,B).

O tratamento com as nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) nas diferentes concentrações de Vitamina E, 1% e 2,5% foi capaz de reverter esse atraso no diabético.

Entretanto, á analise morfométrica realizada com as diferentes concentrações de Vitamina E, não apresentou diferença estatística entre os grupos, controle e diabéticos (Figura 31- A,B).

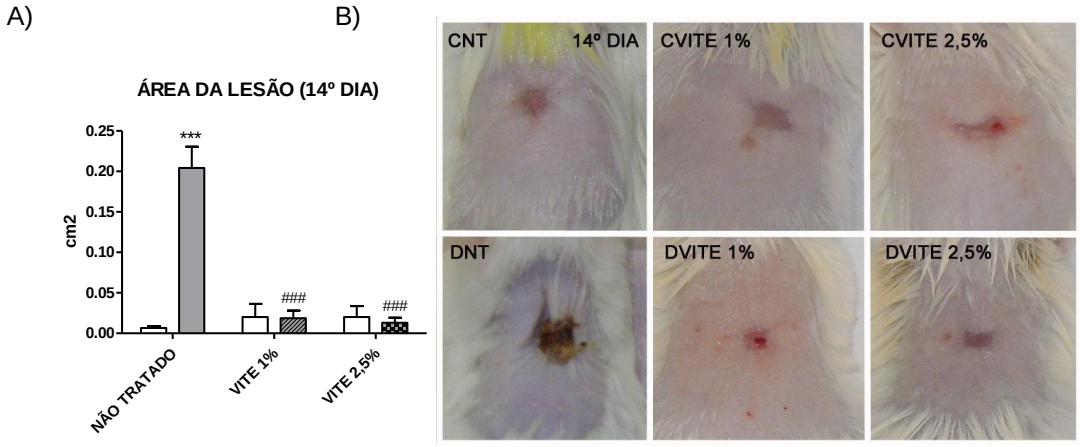


Figura 31 - Área da lesão no 14º dia pós - lesão em camundongos controles e diabéticos não tratados (NT) e tratados com Nano VITE 1% (VITE 1%) e Nano VITE 2,5% (VITE 2,5%). A) Gráfico mostra área, em centímetros quadrados, e **B)** painel mostra a área da lesão, no 14º dia pós - lesão, nos grupos controle e diabético não tratado (CNT e DNT), tratados com Nanopartículas com Vitamina E a 1% (Controle- CVITE 1% e Diabético – DVITE 1%) e Nano com Vitamina E 2,5% (Controle - CVITE 2,5% e Diabético – DVITE 2,5%). Os valores são apresentados como média ± erro-padrão (cm^2) de 04 - 07 animais por grupo. (***) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao controle não tratado, (###) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao diabético não tratado, como indicado por ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.

4.3.1.2 Morfologia

Á analise morfológica mostra que o tratamento tópico com as NLSs, nas diferentes concentrações de Vitamina E, 1% e 2,5%, foi capaz de estimular a migração dos queratinócitos, revertendo o atraso observado no fechamento da lesão no diabético (Figura 32 -).

Mas, o tratamento com o NLSs, na concentração de 1% de Vitamina E, não foi capaz de reduzir o número de células imunes, como observadas no diabético sem tratamento (Figura 32 -). Já o tratamento tópico com NLSs, na concentração de 2,5% de Vitamina E, foi capaz de reverter á presença das células imunes a padrões semelhantes aos grupos controles tratados com NLSs e não tratados (Figura 32 -).

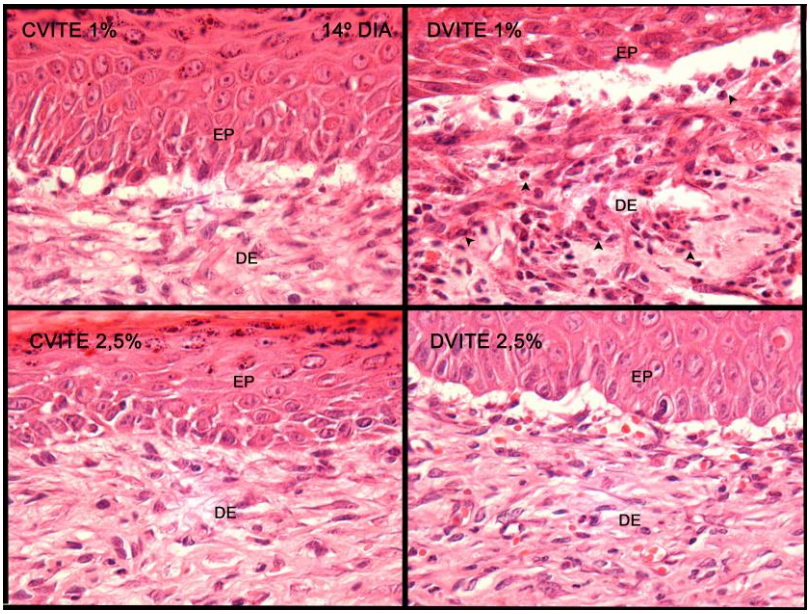


Figura 32 - Micrografia da área da lesão no 14º dia pós - lesão em camundongos controles e diabéticos não tratados (NT) e tratados com Nano VITE 1% (VITE 1%) e Nano VITE 2,5% (NANOVITE 2,5%). Histologia 14º dia pós - lesão, por coloração de H&E. Painel mostra a área da lesão nos grupos controle e diabético, não tratado (Controle Não Tratamento – CNT e Diabético Não Tratado – DNT), tratados com Nano com Vitamina E 1% (Controle – CVITE 1% e Diabético – DVITE 1%) e Nano com Vitamina E 2,5% (Controle – CVITE 2,5% e Diabético – DVITE 2,5%). (Objetiva 20 x).

4.3.1.3 Estresse Oxidativo - TBARS

O aumentado estresse oxidativo, característico da derme do diabético na área da lesão no 14º dia, não foi modificado após o tratamento tópico com as NLSs, na concentração de 1% de Vitamina E, observamos um aumento em ambos os grupos tratados, quando comparado aos seus grupos não tratados. Apesar de, o estresse oxidativo ter diminuído após o tratamento tópico no diabético VITE 1%, quando comparado ao controle VITE 1%.

O tratamento tópico com as NLSs, na concentração de 2,5 % de Vitamina E foi eficaz em reduzir o estresse oxidativo na derme do diabético tratado (VITE 2,5%) a valor semelhante ao controle não tratado, resultado este decisivo para a escolha da concentração de 2,5% de Vitamina E para os demais experimentos.

Embora, o tratamento com ambas as concentrações de vitamina E (1% e 2,5%) tenham aumentado o estresse oxidativo no grupo controle, tal ação não prejudicou a cicatrização da ferida nos grupos controles.

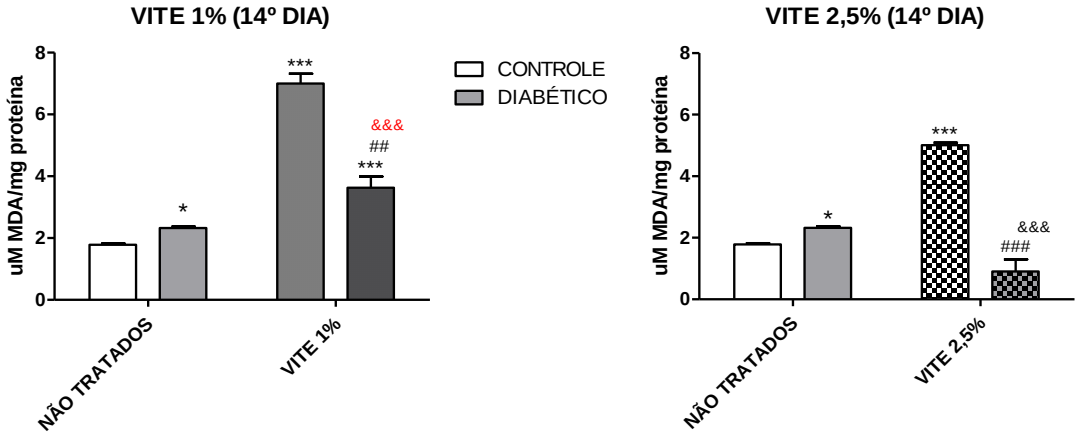


Figura 33 - Avaliação do grau de estresse oxidativo no 14º dia pós - lesão em camundongos controles e diabéticos não tratados (NT) e tratados com nano VITE 1% (VITE E 1%) e Nano VITE 2,5% (VITE 2,5%). Derme da área da lesão no 14º dia, nos grupos controles e diabéticos não tratados (Controle Não Tratado e Diabético Não Tratado), e tratados com Nano com Vitamina E 1% (Controle Diabético – VITE 1%) e Nano com Vitamina E 2,5% (Controle e Diabético – VITE 2,5%). Os valores são apresentados como média ± erro - padrão (µM MDA/mg proteína) de 04 - 07 animais por grupo. (*) $p < 0.1$, (***) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle não tratado; (##) $p < 0.01$, (###) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao diabético não tratado; (&&&) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao controle nano VITE 1 %; (&&&) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao controle nano VITE 2,5% como indicado por ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.

4.3.2 Efeitos dos Diferentes Veículos sobre o Fechamento da Área da Lesão

4.3.2.1 Morfometria – Gel

Com a intenção de avaliarmos, se o gel (Carbopol®Utrex) teria algum efeito sobre a cicatrização, fizemos a aplicação apenas do gel (veículo) sobre a ferida, e realizamos a morfometria da área da lesão nos 3º, 7º, 10º, 12º e 14º dias.

No 3º dia pós - lesão, de acordo com estudo já caracterizado por nosso grupo, a área de cicatrização no diabético não tratado (DNT) está diminuída em relação ao controle não tratado (CNT) (Figura 10 -). Ao aplicarmos o gel (apenas o veículo) na

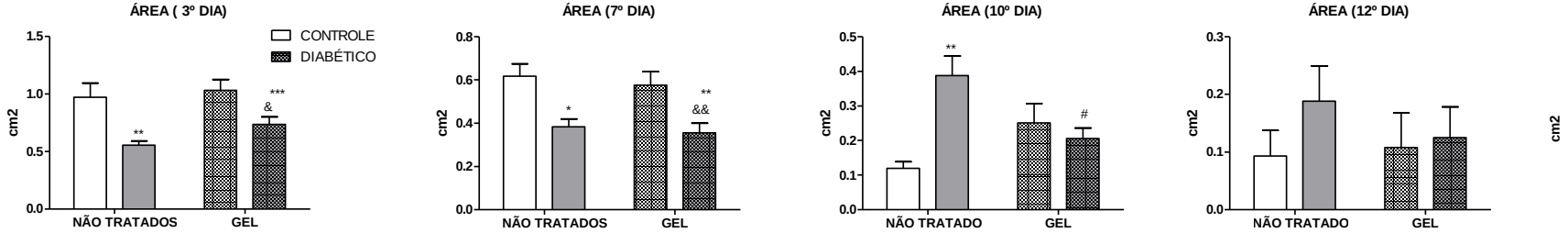
área da lesão nos grupos, não observamos mudanças neste parâmetro, no diabético gel (DG), quando comparado aos grupos controles NT e CG (Figura 34 -).

No 7º dia pós - lesão, observamos o mesmo padrão de fechamento de lesão que no 3º dia. Uma menor área de fechamento nos diabéticos NT e DG, quando comparados aos seus respectivos controles.

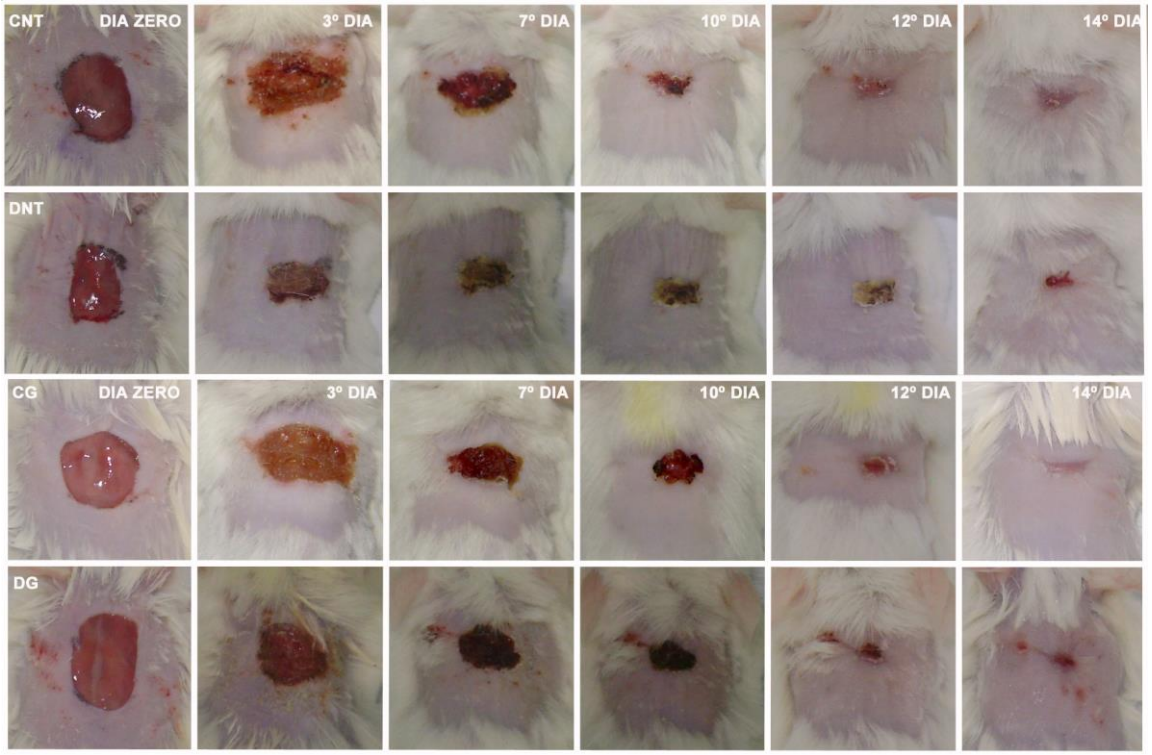
Nos 10º, 12º e 14º dias pós - lesão, o atraso característico no fechamento da lesão no diabético NT foi recuperado pelo tratamento tópico com o gel, com a área do diabético gel igualando-se a área dos grupos CNT e CG; com exceção do DG no 14º dia, que não se recuperou ao nível do CG (Figura 34 -).

Figura 34 - Processo de cicatrização mostrando as diferentes fases de fechamento nos zero, 3º, 7º, 10º, 12º e 14º dias pós - lesão em camundongos controles e diabéticos não tratados (NT) e tratados com Gel (G). A) Gráfico representando área (cm^2) do fechamento da área, mínimo de 04 - 12 animais por grupo. **B)** Painel apresentando a progressão do processo de cicatrização nos grupos controles e diabéticos, não tratado (Controle Não Tratamento – CNT e Diabético Não Tratado – DNT), tratados com gel (Controle – CG e Diabético – DG). Os valores são apresentados como média ± EPM. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle não tratado; (##) $p < 0.01$ (###) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao diabético não tratado; (&&) $p < 0.01$, (&&&) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao controle gel, como indicado por ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.

A)


ÁREA (3º DIA)
CONTROLE
DIABÉTICO
cm2
1.5
1.0
0.5
0.0
**
***
&
NÃO TRATADOS
GEL
ÁREA (7º DIA)
cm2
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
**
&&
NÃO TRATADOS
GEL
ÁREA (10º DIA)
cm2
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
#
NÃO TRATADO
GEL
ÁREA (12º DIA)
cm2
0.3
0.2
0.1
0.0
NÃO TRATADO
GEL
cm2

B)


CNT
DIA ZERO
3º DIA
7º DIA
10º DIA
12º DIA
14º DIA
DNT
CG
DIA ZERO
3º DIA
7º DIA
10º DIA
12º DIA
14º DIA
DG

4.3.2.2 Morfometria – Nanopartícula Branco (NB)

A Nanopartícula Lipídica Sólida (NLS) Branco foi confeccionada apenas com a manteiga de cacau, o lipídio sólido de escolha, para servir como carreador da Vitamina E, e utilizamos o Carbopol®Utrex, para dar a consistência de gel - creme à nanopartícula.

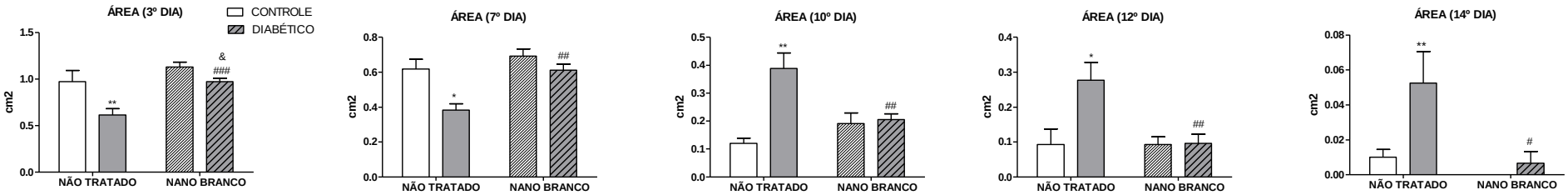
A aplicação tópica da Nano Branco NB aumentou de forma significativa à área da lesão no grupo DNB, na fase inflamatória (3º dia), provavelmente ao edema e presença de células inflamatórias característicos dessa fase em um processo de cicatrização normal, e na fase de granulação (7º dia), pelo aumento da celularidade, recuperando a característica de maior área, própria dos grupos controles NT (Não Tratado) e NB (Figura 35 -).

Na fase final da cicatrização, de remodelação, que corresponde aos 10º, 12º e 14º dias pós - lesão, o tratamento tópico com NB foi capaz de reverter o atraso no fechamento da lesão, característico do diabetes não tratado, no DNB ao nível dos grupos controles NT e NB (Figura 35 -).

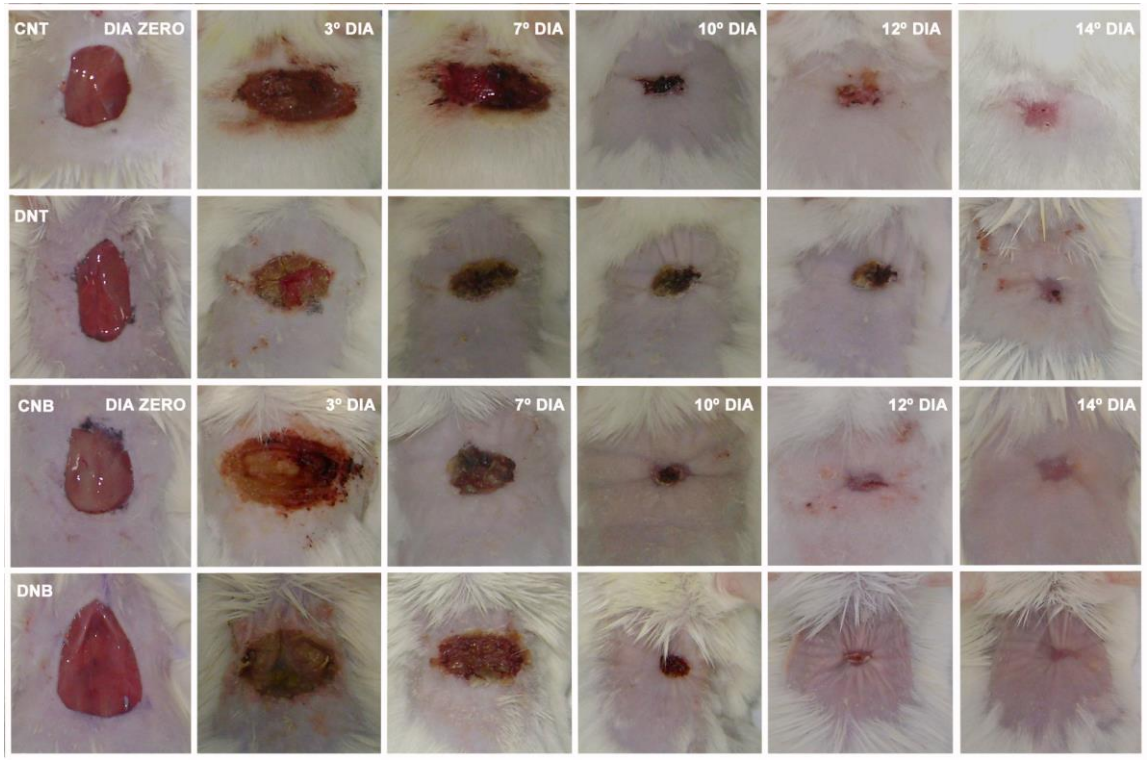
O tratamento tópico com a NB não alterou o fechamento do grupo controle em todas as fases do processo de cicatrização (Figura 35 -).

Figura 35 - Processo de cicatrização mostrando as diferentes fases de fechamento nos zero, 3º, 7º, 10º, 12º e 14º dias pós - lesão em camundongos controles e diabéticos não tratados e tratados com o Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) Nano Branco (NB). A) Gráfico representando área (cm^2) do fechamento da área, mínimo de 04 - 15 animais por grupo. **B)** Painel apresentando a progressão do processo de cicatrização nos grupos controles e diabéticos, não tratado (Controle Não Tratamento – CNT e Diabético Não Tratado – DNT), tratados com NANO BRANCO (Controle – CNB e Diabético – DNB). Os valores são apresentados como média ± EPM. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ para diferenças significativas em relação ao controle não tratado; (#) $p < 0.05$, (##) $p < 0.01$ para diferenças significativas em relação ao diabético não tratado; (&) $p < 0.05$ para diferença significativa em relação ao controle nano - branco (NB), como indicado por ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.

A)


ÁREA (3º DIA)
CONTROLE
DIABÉTICO
cm2
NÃO TRATADO
NANO BRANCO
ÁREA (7º DIA)
ÁREA (10º DIA)
ÁREA (12º DIA)
ÁREA (14º DIA)

B)


CNT
DIA ZERO
3º DIA
7º DIA
10º DIA
12º DIA
14º DIA
DNT
CNB
DNB

4.3.2.3 Morfometria – Nanopartícula VITE 2,5% (VITE 2,5%)

Após a escolha da concentração de 2,5% de Vitamina E para aplicação tópica na ferida diabética; com o aumento do número de animais tratados topicamente com NANOVITE 2,5% (DVITE 2,5%), os grupos controle e diabéticos cicatrizaram no 12º dia.

O tratamento tópico com a nano VITE 2,5% acelerou a cicatrização, no diabético (DVITE 2,5%), em aproximadamente 34%, quando comparado ao diabético não tratado, considerando que o mesmo cicatriza no 18º dia. A aplicação tópica na ferida diabética com a nano branco (DNB) foi eficiente na aceleração da cicatrização, quando comparado ao diabético não tratado (Figura 36 -).

As Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) Nano VITE 2,5% foram confeccionado com a manteiga de cacau, juntamente com a Vitamina E 2,5%, e também utilizamos o Carbopol®Ultrex, para dar a consistência de gel - creme à nanopartícula.

Á analise morfométrica do tratamento tópico com a VITE 2,5% mostrou-se semelhante a aplicação tópica da nano branco (NB) (Figura 36 -).

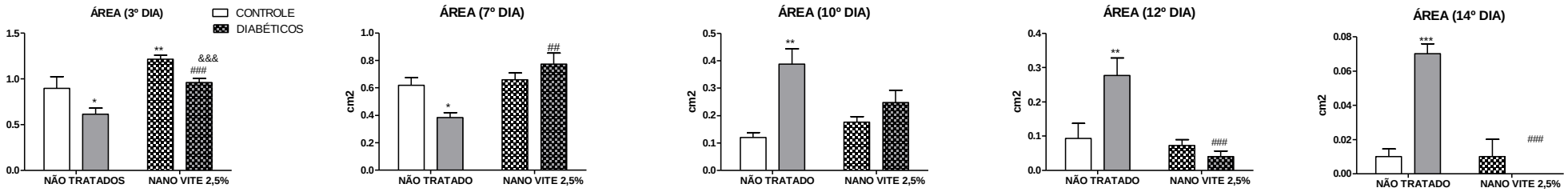
Com aumento significante da área da lesão no grupo DVITE 2,5%, na fase inflamatória (3º dia), e na fase de granulação (7º dia), pelo aumento da celularidade, recuperando a característica de uma área aumentada, própria dos grupos controles NT e CVITE 2,5% (Figura 36 -).

Na fase final da cicatrização, fase de remodelação, os 10º, 12º e 14º dias pós - lesão, o tratamento tópico com VITE 2,5% foi capaz de reverter o atraso no fechamento da lesão, característico do diabetes não tratado, no DVITE 2,5%, assim como no tratamento tópico com a NB, ao nível dos grupos controles NT e CVITE 2,5% (Figura 36 -).

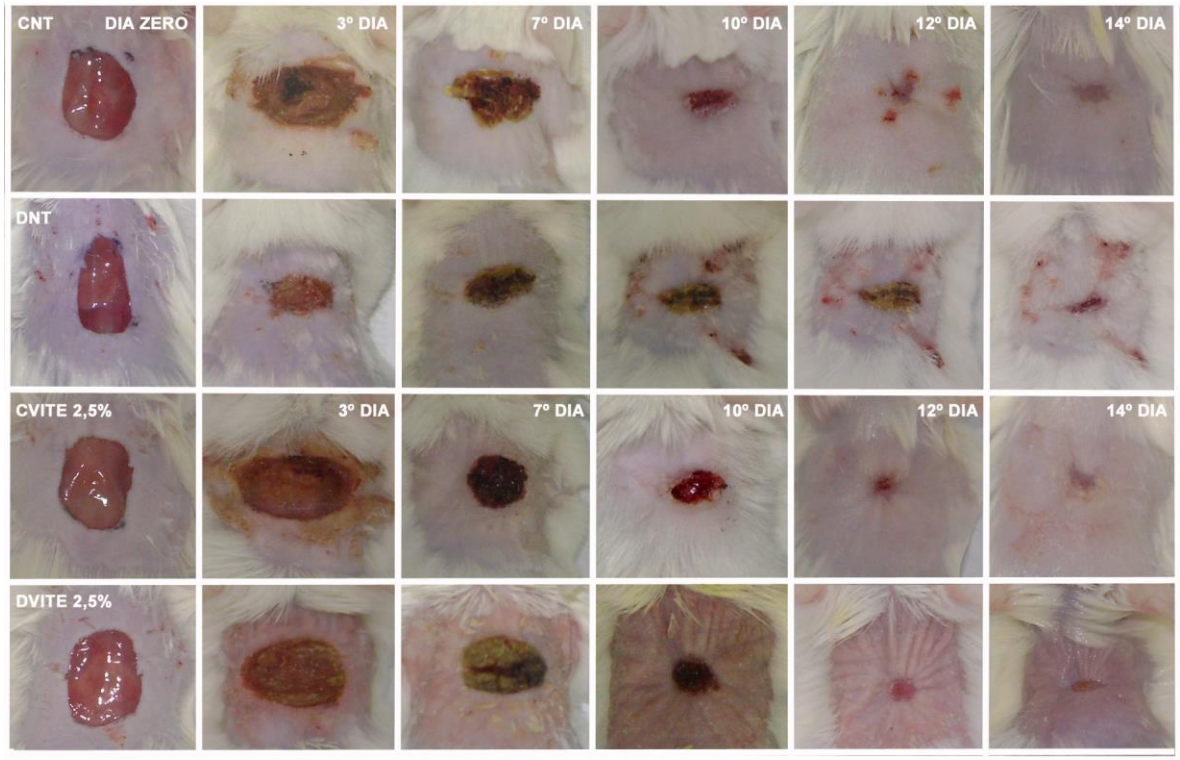
O tratamento tópico com a VITE 2,5%, também não alterou o fechamento do grupo controle em todas as fases do processo de cicatrização (Figura 36 -).

Figura 36 - Processo de cicatrização mostrando as diferentes fases de fechamento nos zero, 3º, 7º, 10º, 12º e 14º dias pós - lesão em camundongos controles e diabéticos não tratados e tratados com o Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs) Nano VITE 2,5% (VITE 2,5%). **A)** Gráfico representando área (cm^2) do fechamento da área, mínimo de 04 - 19 animais por grupo. **B)** Painel apresentando a progressão do processo de cicatrização nos grupos controles e diabéticos, não tratado (Controle Não Tratamento – CNT e Diabético Não Tratado – DNT), tratados com NANO VITE 2,5% (Controle – C VITE 2,5% e Diabético – D VITE 2,5%). Os valores são apresentados como média ± EPM. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.01$ para diferenças significativas em relação ao controle não tratado; (##) $p < 0.01$, (###) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao diabético não tratado; (&&&) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao controle VITE 2,5%, como indicado por ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.

A)


ÁREA (3º DIA)
CONTROLE
DIABÉTICOS
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
&&&
###
NÃO TRATADOS
NANO VITE 2,5%
ÁREA (7º DIA)
cm2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
##
NÃO TRATADO
NANO VITE 2,5%
ÁREA (10º DIA)
cm2
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
NÃO TRATADO
NANO VITE 2,5%
ÁREA (12º DIA)
cm2
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
###
NÃO TRATADO
NANO VITE 2,5%
ÁREA (14º DIA)
cm2
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
***
###
NÃO TRATADO
NANO VITE 2,5%

B)


CNT
DIA ZERO
3º DIA
7º DIA
10º DIA
12º DIA
14º DIA
DNT
CVITE 2,5%
3º DIA
7º DIA
10º DIA
12º DIA
14º DIA
DVITE 2,5%

.3.3 Efeitos do tratamento tópico das NLSs nas diferentes fases do processo cicatricial

Após os achados morfométricos, como a melhora significativa no fechamento da lesão, pelo tratamento tópico com as nanopartículas VITE 2,5% e nano branco (NB) partiu - se para a avaliação morfo-histológica.

Avaliando a fase inflamatória, aguda, no 3º dia pós - lesão, seguida da fase de reparo, avaliada nos 12º e 14º dias pós - lesão.

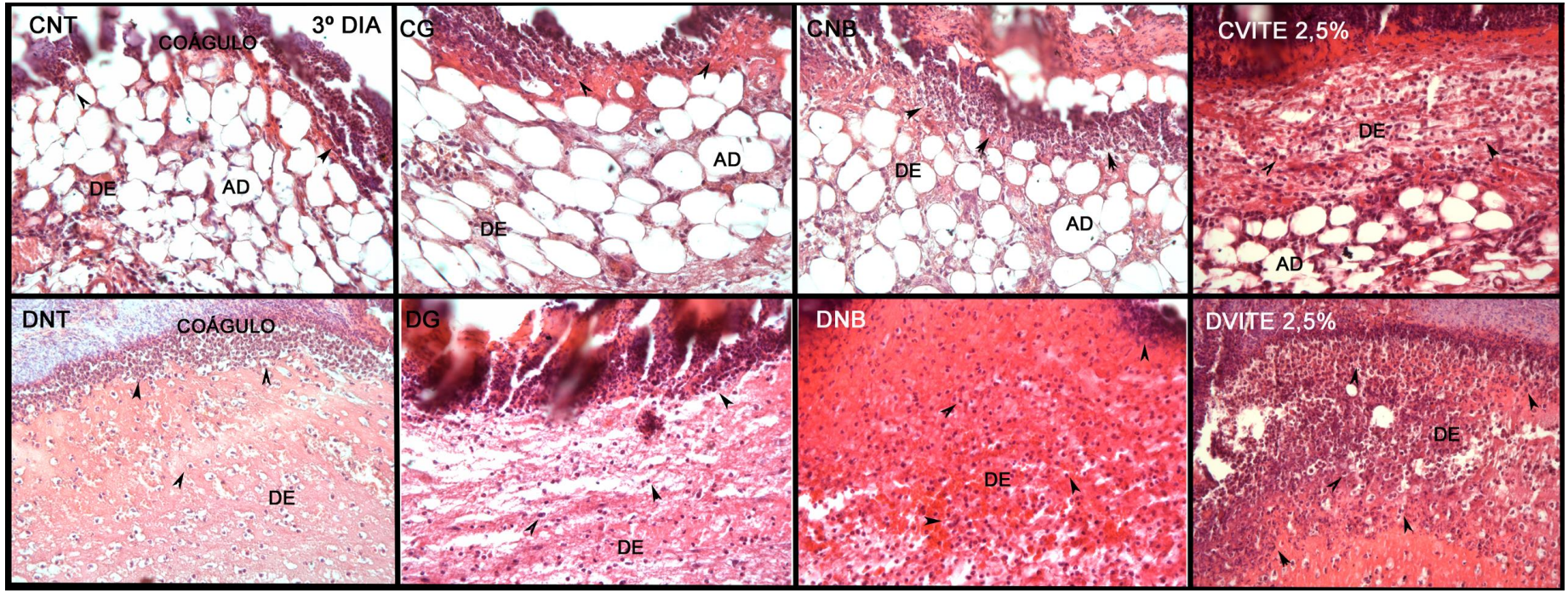
- 3º DIA: Relembrando que o diabético na fase aguda da cicatrização apresenta muito menos células imunes que o seu controle. Assim, como a presença de adipócitos é característica apenas do animal controle.

O tratamento tópico apenas com o gel, não foi capaz de restabelecer a presença de células imunes no local da lesão, após o 3º dia de tratamento, no grupo diabético. No grupo controle não apresentou efeito sobre tais células.

O tratamento tópico com a nano branco (NB) sugere uma melhora no número de células imunes no local da lesão, assim como um espessamento do tecido conjuntivo, no diabético NB.

O tratamento tópico com nano VITE 2,5% aumentou expressivamente o número de células imunes no local da lesão, no grupo diabético DVITE 2,5%, quando comparado aos demais grupos diabéticos não tratados e tratados; além de atuar no tecido conjuntivo tornando o mais espesso, em ambos os grupos tratados com a vitamina E (Figura 37 -).

Figura 37 - Área da lesão no 3º em camundongos controles e diabéticos não tratados (NT) e tratados com Gel (G), Nano Branco (NB) e Nano VITE 2,5% (VITE 2,5%). O painel mostra a morfohistologia da lesão, no 3º dia pós - lesão, nos grupos controles e diabéticos não tratado (Controle Não Tratado – CNT e Diabético Não Tratado – DNT) e tratados com Gel (Controle – CG e Diabético – DG), NANO BRANCO (Controle – CNB e Diabético – DNB) e NANO VITE 2,5% (Controle – CVITE 2,5% e Diabético – DVITE 2,5%). Coloração de HE. EP = epitélio; DE = derme; V = vaso; AD = adipócito; cabeça de seta indica células imunes. Objetiva 20 x.


CNT
3º DIA
COÁGULO
DE
AD
CG
AD
DE
CNB
DE
AD
CVITE 2,5%
DE
AD
DNT
COÁGULO
DE
DG
DE
DNB
DE
DVITE 2,5%
DE

- 12º DIA: Á analise morfo-histológica da área da lesão no 12º dia apresenta a reepitelização, a persistência de fibras colágenas fibrosas e a persistência de células imunes no grupo controle. Em contrapartida, o animal diabético apresenta atraso na reepitelização, persistência de células imunes e o coágulo (crosta), e um tecido conjuntivo não remodelado, características semelhantes ao diabético no 14º dia pós - lesão.

O tratamento com o gel (DG) não foi suficiente para reverter os parâmetros acima citados do diabético sem tratamento (DNT), e não demonstrou efeitos significativos no controle.

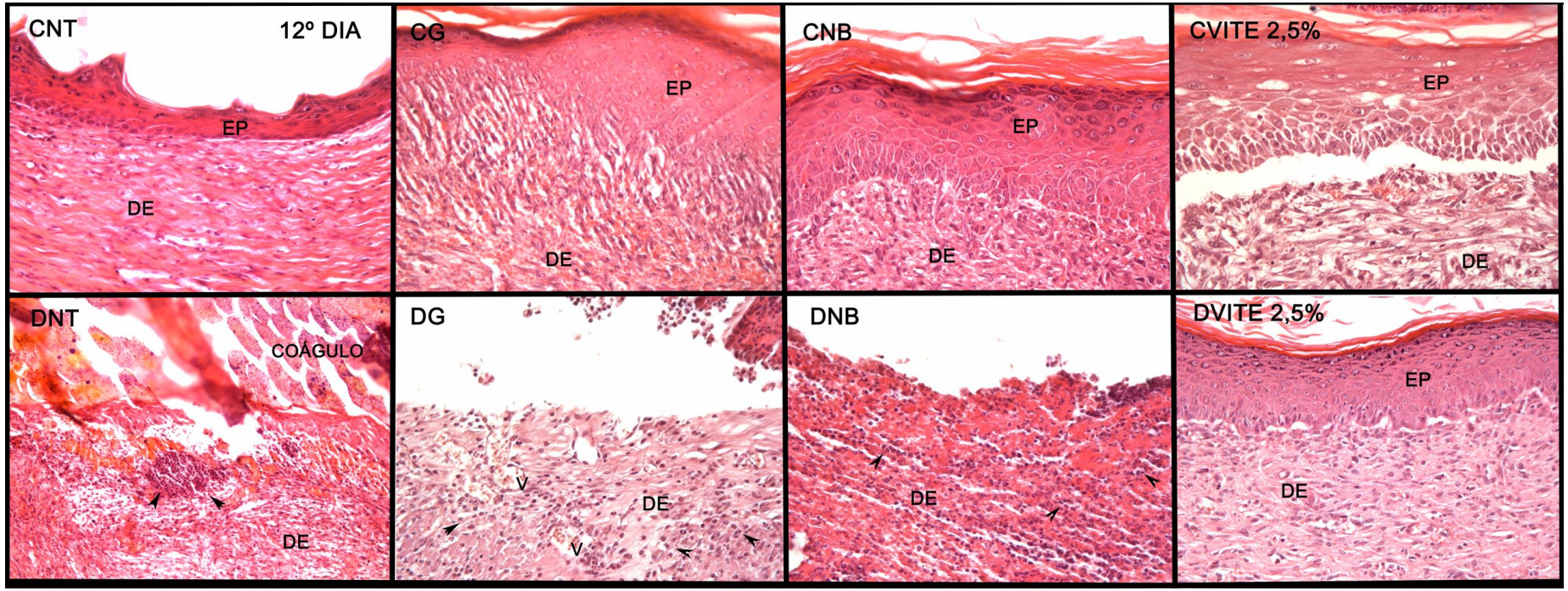
Embora, a morfometria não tenha apresentado diferença significativa quando comparamos o DNB com o DNT, o tratamento tópico, apenas com a nano branco (NB), no grupo diabético DNB, não foi suficiente para reestabelecer os parâmetros morfo-histológicos nessa fase, na ferida diabética; e não apresentou maiores efeitos sobre o grupo controle (NB).

Como podemos confirmar, pela morfo-histologia, o tratamento tópico com nano VITE 2,5% foi capaz de reepitelizar, reestabelecer a malha pantográfica da derme e reestabelecer as células residentes da derme, como fibroblastos e células imunes, no grupo diabético DVITE 2,5%, a parâmetros semelhantes ao da pele sem lesão (figura 5 -). Não consideramos os apêndices celulares, como os folículos pilosos, que não estão presentes na área da lesão, mesmo após a total cicatrização.

No animal controle CVITE 2,5%, observamos um desprendimento do epitélio da derme, apesar da reepitelização presente. Em ambos os grupos, que receberam o tratamento tópico com VITE 2,5%, observou um aumento de células na derme, principalmente fibroblastos.

Sugerindo, que apenas a Vitamina E, está atuando na melhora da cicatrização, enquanto o nano branco (NB), não foi eficaz em modificar tais parâmetros analisados (Figura 38 -).

Figura 38 - Área da lesão no 12º dia em camundongos controles e diabéticos não tratados (NT) e tratados com Gel (G), Nano Branco (NB) e Nano VITE 2,5% (VITE 2,5%). O painel mostra a morfohistologia da lesão, no 12º dia pós - lesão, nos grupos controles e diabéticos não tratados (Controle Não Tratado – CNT e Diabético Não Tratado – DNT) e tratados com Gel (Controle – CG e Diabético – DG), Nano Branco (Controle – CNB e Diabético – DNB) e NANOVITE 2,5% (Controle – CVITE 2,5% e Diabético – DVITE 2,5%). Coloração de HE. EP = epitélio; DE = derme; cabeça de seta indica células imunes. Objetiva 20 x.


CNT
12º DIA
EP
DE
CG
EP
DE
CNB
EP
DE
CVITE 2,5%
EP
DE
DNT
COÁGULO
DE
DG
V
DE
V
DNB
DE
DVITE 2,5%
EP
DE

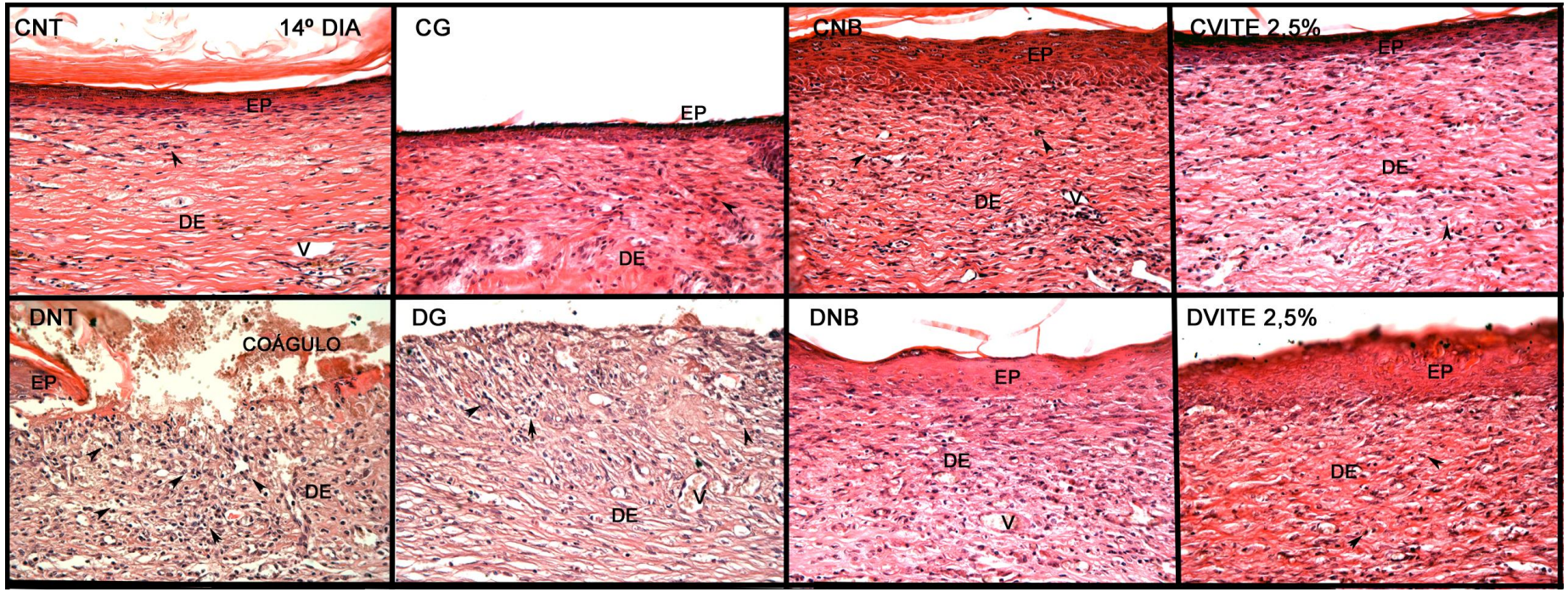
- 14º DIA: Como já observado, o grupo diabético (DNT) apresenta um proeminente atraso na cicatrização quando comparado ao seu controle (CNT) (Figura 21 -).

O tratamento com o gel foi capaz de diminuir a presença das células imunes, mas não reverteu o atraso na reepitelização e não diminuiu a presença de vasos sanguíneos no grupo diabético (DG), quando comparado ao seu controle (CG).

Já o tratamento tópico com a NB atuou de forma positiva sobre a reepitelização, mas ainda observamos células imunes e neovasos na derme do grupo diabético (DNB), quando comparado ao diabético não tratado (DNT). No grupo controle (CNB) o que observamos é a recuperação da malha pantográfica quando comparado ao controle não tratado (CNT).

Nos animais que receberam o tratamento tópico com a nano VITE 2,5%, o que nos chama a atenção é o arranjo das fibras colágenas da derme, em ambos os grupos. A reepitelização, a diminuição das células imunes e dos neovasos são observados nessa fase, em ambos os grupos tratados. Mas no diabético DVITE 2,5% a morfo-histologia se assemelha ao controle sem lesão (Figura 21 -) e ao seu controle CVITE 2,5% (Figura 39 -).

Figura 39 - Área da lesão no 14º dia em camundongos controles e diabéticos não tratados (NT) e tratados com Gel (G), Nano Branco (NB) e Nano VITE 2,5% (VITE 2,5%). O painel mostra a morfohistologia da lesão, no 14º dia pós-lesão, nos grupos controles e diabéticos não tratados (Controle Não Tratado – CNT e Diabético Não Tratado – DNT) e tratados com Gel (Controle –CG e Diabético – DG), Nano Branco (Controle –CNB e Diabético – DNB) e Nano com Vitamina E 2,5% (Controle – CVITE 2,5% e Diabético – DVITE 2,5%). Coloração de HE. EP = epitélio; DE = derme; V = vaso; cabeça de seta indica células imunes. Objetiva 20 x.


CNT
14º DIA
EP
DE
V
CG
EP
DE
CNB
EP
DE
V
CVITE 2,5%
EP
DE
DNT
COÁGULO
EP
DE
DG
V
DE
DNB
EP
DE
V
DVITE 2,5%
EP
DE

4.3.4 Fibras colágenas

As analises realizadas com H&E, mostraram um tecido conjuntivo mais denso e organizado nos animais tratados com a nano VITE 2,5% e nano branco (NB).

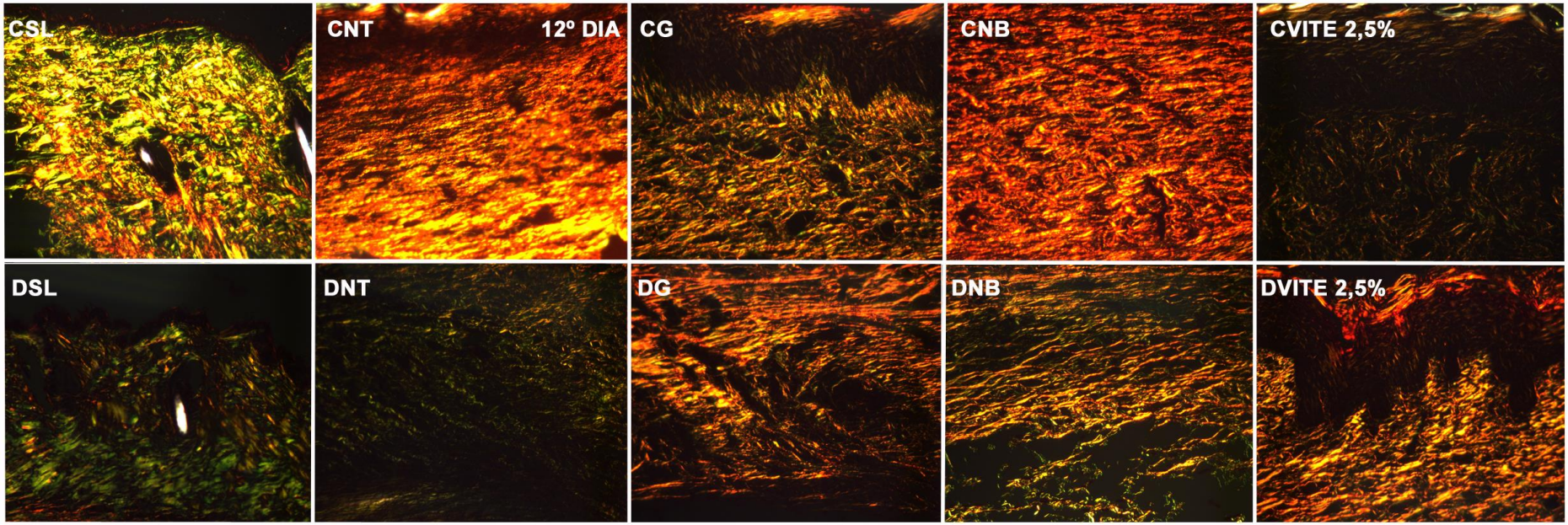
Ao avaliarmos por meio da luz polarizada a coloração de picrosirius, obtivemos os seguintes resultados.

No grupo controle (CNT), na derme da área da lesão no 12º dia, observamos a predominância de fibras colágenas tipo I fibrosas. Após o tratamento tópico do grupo controle, com o gel e a nano VITE 2,5%, obtivemos um padrão muito semelhante ao da pele sem lesão do controle, com a recuperação da malha pantográfica e a presença de fibras colágenas tipo I e III. O mesmo não foi observado no grupo controle, que recebeu apenas a nano branco (NB), permaneceu com as características semelhantes ao controle (CNT) no mesmo período (Figura 40 -).

Nos grupos diabéticos, a derme sem lesão (SL) e a derme lesão (NT), no 12º dia pós-lesão, a predominância de fibras colágenas do tipo III é nítida ao compararmos com seus respectivos controles. Os tratamentos tópicos, na derme dos diabéticos com gel (DG) e nano branco (DNB) foram capazes de aumentar a presença de fibras colágenas tipo I, mas com características fibrosas, semelhantes ao controle NT.

O grupo diabético tratado com a nano VITE 2,5% (DITE 2,5%) substitui o colágeno tipo III (verde), por tipo I (amarelo e vermelho), o que é um indício da maturação das fibras colágenas, além de recuperar a malha pantográfica, característica da pele sem lesão, nos grupos controle e diabético (Figura 40 -).

Figura 40 – Fibras colágenas na área da lesão no 12º dia em camundongos controles e diabéticos sem lesão (SL), não tratados (NT), tratados com Gel (G), Nano Branco (NB), Nano VITE 2,5% (VITE 2,5%). O painel mostra as fibras colágenas tipo I, amarelas a vermelhas, e do tipo III, predominantemente verde, na área lesão, no 12º dia pós - lesão, nos grupos controles e diabéticos não tratados (Controle Não Tratado – CNT e Diabético Não Tratado – DNT) e tratados com Gel (Controle – CG e Diabético – DG), Nano Branco (Controle – CNB e Diabético – DNB) e NANOVITE 2,5% (Controle – CVITE 2,5% e Diabético – DVITE 2,5%). Coloração de Picrosirios Red. Aumento 16 x.


CSL
CNT
12º DIA
CG
CNB
CVITE 2,5%
DSL
DNT
DG
DNB
DVITE 2,5%

4.3.5 Estresse Oxidativo - MDA

Para avaliarmos o potencial antioxidante das nanopartículas, aplicadas topicamente, contendo vitamina E 2,5%, e se a aplicação de apenas o gel e a nano branco teriam efeitos sobre o estresse oxidativo, medimos a redução do MDA.

Dentre as variações estatísticas encontradas, quando comparamos os grupos entre si, o que vale destacar é a expressiva redução do estresse oxidativo no grupo diabético NANO VITE 2,5% (DVITE 2,5%), quando comparado aos demais tratamentos em ambos os grupos controles e diabéticos não tratados e tratados com gel e nano branco.

Embora, os animais controles, que receberam os diferentes tratamentos tópicos, apresentarem aumento do estresse oxidativo, tal fato não interferiu no fechamento da lesão e na morfohistologia da área da lesão.

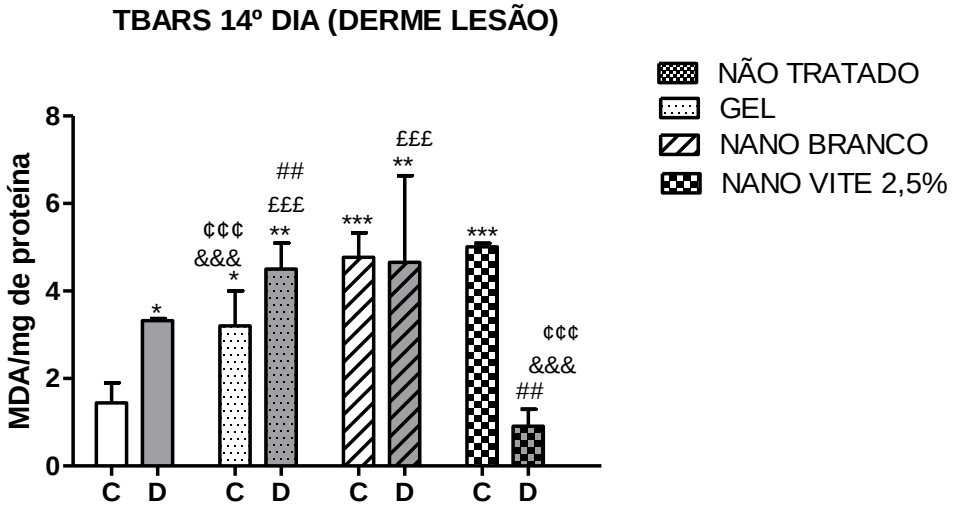


Figura 41 - Avaliação do grau de estresse oxidativo na derme no 14º dia pós - lesão em camundongos controles e diabéticos não tratados e tratados com gel (G), nano branco (NB) e Nano VITE 2,5% (NANO VITE 2,5%). Medida do MDA na derme da área da lesão no 14º dia pós - lesão, nos grupos controle (C) e diabético (D) não tratados e tratados com gel, nano branco e nano VITE E 2,5%. Os valores são apresentados como média ± erro - padrão (MDA/mg proteína) de 04 - 07 animais por grupo. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle não tratado; (##) $p < 0.01$ para diferenças significativas em relação ao diabético não tratado; (&&) $p < 0.01$, (&&&) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao controle nano VITE 2,5%; (£££) $p < 0.001$para diferenças significativas em relação ao diabético nano VITE 2,5%; (¢¢¢) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle nano branca, como indicado por ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.

4.3.6 Citocinas Tratamento Tópico

4.3.6.1 Fase Inflamatória

O padrão de baixos níveis de citocinas inflamatórias persistiu no grupo diabético não tratado.

O tratamento tópico com as nanopartículas nano branco (NB) e VITE 2,5% modulou de forma pró-inflamatória as citocinas IL - 1β, KC e IL - 12p40, na fase aguda, 3º dia pós - lesão, nos grupos controle e diabético, contribuindo para o aumento das citocinas inflamatórias aqui citadas, o que consequentemente aumentou o fluxo de células imunes para a área da lesão, como observado na analise morfo-histológica na derme.

As citocinas TNF - α e IL - 4 não foram moduladas pelo tratamento tópico com as nanopartículas, nessa fase.

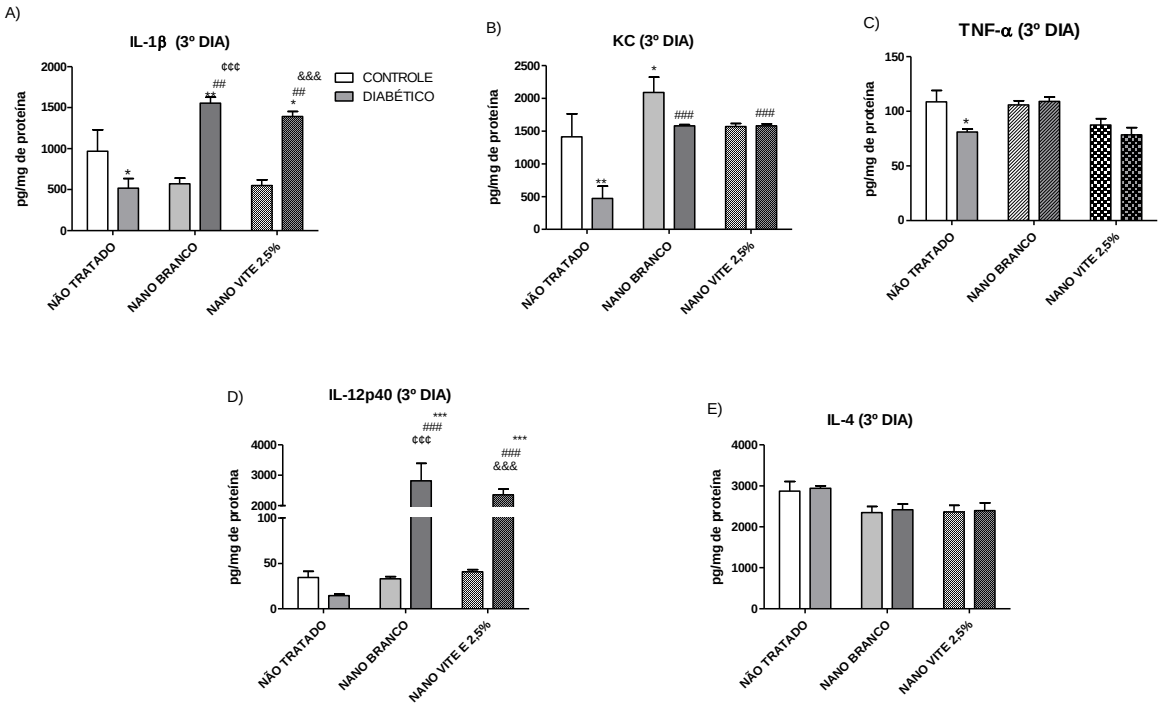


Figura 42 - Citocinas inflamatórias IL - 1β, KC, TNF - α, IL - 12p40 e IL - 4 no 3º dia pós - lesão, na derme de camundongos controles e diabéticos não tratados e tratados com Nano Branco e Nano VITE 2,5%. Medida das citocinas (por ELISA) na derme subjacente à lesão, nos grupos controles e diabéticos não tratados e tratados com nano branco e nano VITE 2,5%. Os valores são apresentados como média ± erro - padrão (pg/mg de proteína) de 3 - 6 animais por grupo. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle não tratado; (##) $p < 0.01$, (###) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao diabético não tratado; (&&) $p < 0.01$, (&&&) $p < 0.001$ para diferença significativa em relação ao controle nano VITE 2,5%; (£££) $p < 0.001$para diferenças significativas em relação ao diabético nano VITE 2,5%; (¢¢)$p < 0.01$, (¢¢¢) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle nano branco, como indicado por ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.

4.3.6.2 Fase Final da Cicatrização - Reparo

Em nosso modelo experimental, a fase final da cicatrização no grupo controle ocorre no 14º dia pós - lesão, com a reepitelização e recuperação da área lesionada.

Após o tratamento tópico com as nanopartículas branco (NB) e VITE 2,5% observamos a aceleração na fase final da cicatrização, que ocorreu no 12º dia pós - lesão, nos grupos controles e diabéticos tratados.

Nesta fase, o tratamento tópico com as nano branco (NB) e nano VITE 2,5% modularam a secreção das citocinas inflamatórias IL - 1β, KC, TNF - α e IL - 4, diminuindo seus níveis, na derme dos grupos diabéticos tratados quando comparados ao grupo diabético não tratado.

No grupo controle NB, apesar do aumento das citocinas KC, TNF - α e IL - 12p40 o fechamento da lesão não foi prejudicado.

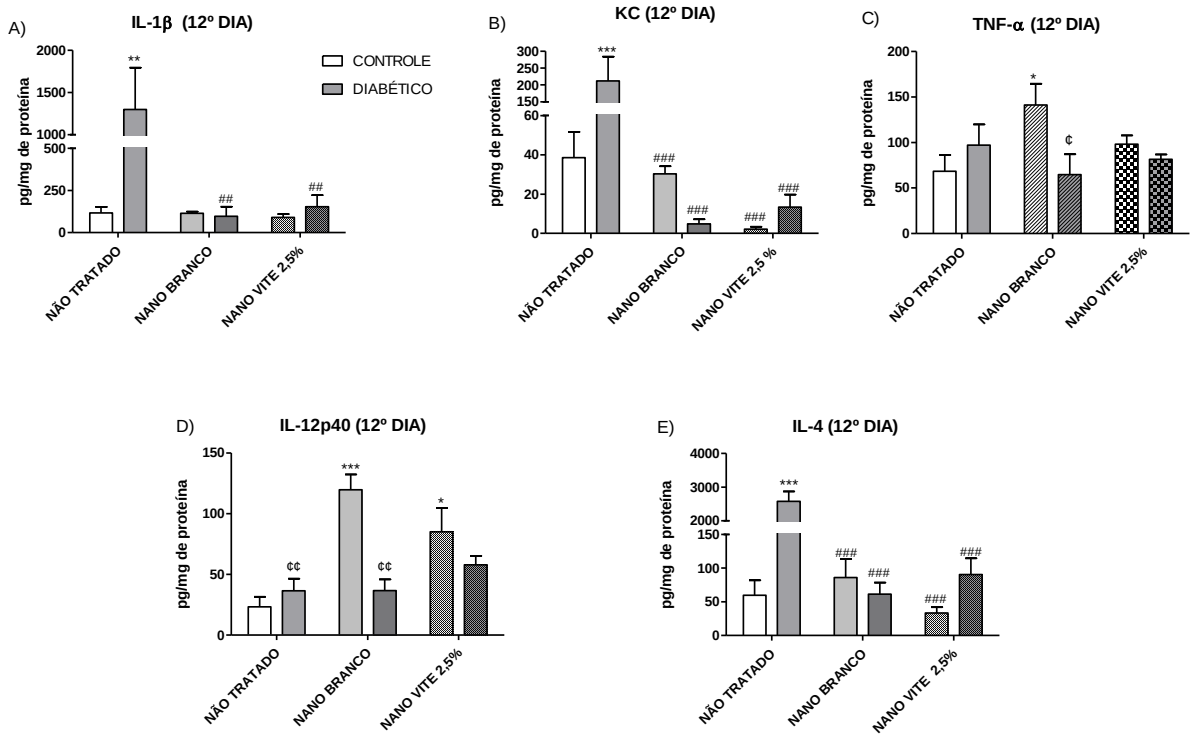


Figura 43 - Citocinas inflamatórias IL - 1β, KC, TNF - α, IL – 12p40 e IL - 4 no 12º dia pós - lesão, na derme de camundongos controles e diabéticos não tratados e tratados com Nano Branco (NANO BRANCO) e Nano VITE 2,5% (NANO VITE 2,5%). Medida das citocinas (por ELISA) na derme subjacente à lesão, nos grupos controles e diabéticos não tratados e tratados com nano branco e nano VITE 2,5%. Os valores são apresentados como média ± erro-padrão (pg/mg de proteína) de 3 - 6 animais por grupo. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao controle não tratado; (##) $p < 0.01$, (###) $p < 0.001$ para diferenças significativas em relação ao diabético não tratado; (¢) $p < 0.05$, (¢¢) $p < 0.01$ para diferenças significativas em relação ao controle nano branco, como indicado por ANOVA two - way e pós - teste de Bonferroni.

5 DISCUSSÃO

Estudos sobre a cicatrização deficiente no DM, os mecanismos envolvidos nesta deficiência e sua contribuição para as feridas crônicas, especialmente em membros inferiores, têm sido amplamente realizados, tanto em humanos (Rosenberg, 1990) quanto em modelos animais (Fahey III, et al., 1991; Wetzler, 2000; Papazoglou et al., 2010), ou ambos (Lima et al., 2012).

Diversas complicações de longo prazo do DM, inclusive a cicatrização deficiente, são provocadas ou pioradas pelo estresse oxidativo e pelos produtos finais da glicação avançada (AGEs) (Blakytny, Jude, 2006; Brownlee, 2001). Estes últimos modificam proteínas de maneira aleatória, podendo alterar sua função. Neste sentido, o uso de antioxidantes para prevenir ou compensar alguns dos efeitos deletérios da hiperglicemia tem se mostrado uma boa opção para a prevenção e tratamento de complicações desta doença (Scott, King, 2004).

Fardoun (2007) associou de forma direta algumas complicações decorrentes da hiperglicemia, como por exemplo, o aumento dos riscos de doenças cardiovasculares e microangiopatia, aos baixos níveis plasmáticos de vitaminas E e C. A Vitamina C é essencial para a formação do colágeno (Barnes, 1975) e a deficiência de vitamina E gera anormalidades neuromusculares (Brigelius - Flohe, Traber, 1999). Em diabéticos, alterações nos mecanismos de transporte da vitamina C prejudicam a sua absorção e, consequentemente, a formação de colágeno (Cunningham, 1988).

Existem, no entanto, controvérsias quanto à suplementação com antioxidantes. Estudo recente, por exemplo, demonstrou um aumento da mortalidade de mulheres mais velhas que foram suplementadas com antioxidantes (Mursu et al., 2011). A suplementação com as vitaminas C e E em pacientes diabéticos tem apresentado resultados paradoxais, provavelmente devido aos efeitos pró-oxidantes que essas vitaminas podem exercer, dependendo da concentração (Asleh, Levy, 2010). Por outro lado, melhoras na disfunção endotelial e no processo de cicatrização de fraturas foram observadas com a administração de antioxidantes (Alper G et al., 2006; Sarisözen et al., 2002).

Pouco se sabe sobre a atuação da associação das vitaminas C e E na cicatrização de feridas diabéticas. Recentemente, Park e Lim (2011) demonstraram aceleração do fechamento da lesão na fase inicial da cicatrização (fase inflamatória), em animais diabéticos, após suplementação com as vitaminas C e E na dieta. Os

autores observaram redução da hiperglicemia e atribuíram a melhora na cicatrização a este fato. No presente estudo, no entanto, a suplementação com vitaminas E e C por via oral não alterou o quadro hiperglicêmico e os parâmetros indicativos de DM; além disso, na fase inicial da cicatrização observamos um atraso na reação inflamatória, inclusive com redução do edema na área da ferida.

Embora na derme sem lesão dos diabéticos a quantidade de macrófagos M1 (MIG) tenha sido ligeiramente maior e a de macrófagos M2 menor que em animais controle, sugerindo uma maior propensão à inflamação, no 3º dia pós - lesão observou - se quantidades reduzidas de granulócitos e macrófagos (CD11b), assim como de neutrófilos (Ly6G) na derme daqueles animais. Estes resultados corroboram estudos que mostraram alterações em diferentes vias de ativação dos macrófagos e diminuição no número de leucócitos no DM (Miao et al.,2012; Mirza, Koh, 2011). O retardo no processo inflamatório da ferida em animais diabéticos poderia estar associado a alterações em células endoteliais, aumento da expressão de moléculas de adesão em neutrófilos (Roep et al., 1996), diminuição na produção das espécies reativas pelos fagossomos (Sato et al, 1992; Wiersma et al., 2008) e de citocinas pró - inflamatórias (Fahey III et al. 1991).

Na derme sem lesão do grupo controle, no período que equivaleria ao 3º dia pós - lesão, as únicas citocinas detectadas foram IL - 1β e IL - 12p40; em diabéticos, ao contrário, todas as citocinas avaliadas estavam presentes (IL - 1β, TNF - α, IL - 4 e IL - 12p40), confirmando uma tendência pró - inflamatória. Até o presente momento, não encontramos descrição a respeito da presença de citocinas inflamatórias na derme sã, como realizado em nosso estudo.

De maneira geral, as citocinas inflamatórias aumentaram na pele dos animais controle com a lesão, com exceção da IL - 4 e IL - 12p40. A IL - 12p40 é produzida por células dendríticas e macrófagos (Abdi, 2002). O período de análise 72 h após a lesão pode ter contribuído para não se observar a diferença no nível da IL - 12p40 entre animais sem lesão e com lesão, uma vez que o pico da presença de macrófago M1 ocorre em 42 horas (Mahdavian Delavary et al., 2011). As EROs, naturalmente aumentadas na lesão em animais controle devido à presença das células inflamatórias, ativam vias como a do NF - κB, que aumenta a produção de citocinas inflamatórias; além disso, algumas citocinas, como por exemplo o TNF - α, aumentam a produção endógena de ROS, o que retroalimenta o processo inflamatório (Droge, 2002).

Corroborando os resultados que sugerem uma reação inflamatória menos intensa nos animais diabéticos no 3º dia pós - lesão, as citocinas IL - 1β, TNF - α e IL - 12p40 estavam muito reduzidas em comparação aos controles. Ebaid et al. (2011) já haviam demonstrado níveis reduzidos das citocinas pró-inflamatórias IL - 6, TNF - α e IL - 1β na fase inicial da ferida em animais diabéticos.

O tratamento com as vitaminas antioxidantes aumentou os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF - α e IL - 1β nos diabéticos, a níveis semelhantes ao controle. Além disso, o tratamento aumentou a área da lesão e a celularidade da ferida no 3º dia pós - lesão, sugerindo melhora da resposta inflamatória. Sabe-se que a administração de vitaminas C e E melhora a expressão das citocinas, síntese da matriz extracelular e de fatores de crescimento, talvez pela detoxificação das espécies reativas (Scott, King, 2004). A vitamina E, particularmente, reage diretamente com o radical peroxil, superóxido e o oxigênio *singlet,* protegendo as membranas da peroxidação lipídica. A vitamina C, por sua vez, além da ação antioxidante, recicla o radical tocoferil na forma de tocoferol (Maritim et al., 2003).

Na fase tardia da cicatrização, houve atraso na reepitelização e todas as citocinas, inclusive KC (IL - 8) e exceto IL - 12p40, estavam significativamente aumentadas nos diabéticos, em comparação aos animais controle com lesão. Além disso, macrófagos M1 (MIG^+) estavam aumentados e M2 ($CD206^+$) estavam reduzidos, sugerindo uma persistência da reação inflamatória nos diabéticos, enquanto os animais controle já apresentavam melhor resolução da ferida. Neste sentido, estes resultados confirmam os resultados relatados por Gonzalez et al. (2012), mostrando que na fase crônica da cicatrização, monócitos derivados de pacientes diabéticos apresentaram aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF - α, IL - 8, IL - 6 e IL - 1β em relação a monócitos de pacientes normoglicêmicos. É possível que a persistência de macrófagos na fase final da cicatrização esteja relacionada ao aumento das quimiocinas MIP - 2 (Proteína Inflamatória para Macrófago tipo 2) e MCP - 1 (Proteína Quimiotática para Macrófago tipo 1), produzidas por macrófagos e queratinócitos em animais diabéticos, conforme reportado anteriormente para camundongos *db/db* (Wetzler et al., 2000;) e animais induzidos ao diabetes (Ebaid et al., 2011). Mirza et al. (2011) recentemente descreveram alterações nas vias de ativação de macrófagos na fase crônica da cicatrização em diabéticos, resultando na persistência de citocinas e células inflamatórias e contribuindo para o atraso na cicatrização da ferida.

Fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais são estimulados pelos macrófagos (Mahdavian Delavary et al., 2011).

Sen e Roy (2008) fizeram uma extensa revisão sobre a ação de EROs em todas as fases do processo de cicatrização. Estas moléculas têm, como função primária, atuar como agentes “desinfetantes” da ferida, mas também exercem papel de mensageiros de sinalização celular em diferentes vias. A produção excessiva das espécies reativas (EROS e ERNs), no entanto, exacerba a resposta inflamatória, sobrecarregando o sistema antioxidante (Wagener et al., 2013). Macrófagos ativados na presença de estresse oxidativo intensificaram a resposta inflamatória (Marcil et al., 2011). Por outro lado, a vitamina C protegeu os macrófagos contra o estresse oxidativo durante a fagocitose e preservou o α - tocoferol nas membranas celulares (May et al., 2005).

Neste estudo, o tratamento com antioxidantes melhorou o aspecto da ferida, estimulando a reepitelização. Também reduziu a quantidade de macrófagos M1 nos diabéticos em relação ao controle, concomitantemente a uma redução de todas as citocinas, especialmente KC e IL - 4, que ficaram com níveis menores que aqueles observados nos animais controle.

As enzimas antioxidantes endógenas são responsáveis pelo equilíbrio dos níveis de espécies reativas, para que o processo inflamatório seja mantido, sem danos teciduais excessivos (Schäfer, Werner, 2008; Wagener et al., 2013). O MDA e os hidroperóxidos lipídicos (LPO) podem ser considerados biomarcadores do estresse oxidativo (Ho et al., 2013). Os aldeídos reativos como 4 - HNE e o MDA são compostos carbonila reativos (CCR), moléculas estáveis e, por isso, mais danosas que as EROS. Os CCR são considerados segundos mensageiros dos radicais livres e são capazes de gerar uma inflamação de baixa intensidade (Jaganjac et al., 2013).

A função principal das enzimas antioxidantes como a catalase, glutationa redutase (GR), peroxidase (GPx) e Superóxido Dismutase (SOD) é detoxificar as espécies reativas, transformando-as em espécies não radicalares, como por exemplo o peróxido de hidrogênio, ou em água (Bickers, Atha, 2006). O peróxido de hidrogênio é convertido em água e oxigênio pela glutationa peroxidase ou catalase, na mitocôndria e lisossomos (Johansen et al., 2005). A função da enzima glutationa redutase (GR) é converter a glutationa oxidada (GSSG) em glutationa (GSH), que atua como um antioxidante intracelular (Halliwell, Gutteridge, 2012).

Maritim et al. (2003), em uma revisão, concluíram que em modelos experimentais de diabetes em animais a atividade das enzimas antioxidantes está reduzida. Num estudo recente utilizando homogenato de feridas diabéticas, as enzimas catalase e GPx apresentaram atividade diminuída, enquanto SOD apresentou atividade aumentada (Lavanya et al., 2012). Aparentemente, diferentes atividades enzimáticas antioxidantes podem ser observadas na pele sã e na pele lesada em animais diabéticos (Schäfer, Werner, 2008).

No atual estudo diferenças na atividade das enzimas antioxidantes na pele sem lesão foram observadas apenas após 44 dias de DM (14º dia pós - lesão). Houve aumento da catalase, GR e GPx, enquanto a SOD não se alterou. Na fase tardia da cicatrização, no diabético houve aumento da catalase e GPx em comparação ao controle, o que foi muito atenuado após o tratamento com vitaminas antioxidantes. A persistência das citocinas inflamatórias e leucócitos, que por si só aumentam a liberação de espécies reativas no local da lesão, certamente contribuiu para o aumento da atividade enzimática. A redução dos níveis da atividade das enzimas antioxidantes e da produção de CCR e MDA em animais diabéticos tratados com antioxidantes sugerem que o tratamento foi efetivo na modulação do estresse oxidativo na fase final da cicatrização.

O resultado mais curioso, no entanto, foi observado na fase inicial da cicatrização (3º dia pós - lesão). Os animais diabéticos apresentaram aumento significativo de todas as enzimas estudadas; o tratamento com vitaminas antioxidantes não alterou a atividade destas enzimas nos animais diabéticos, mas houve um aumento desta atividade em animais controle. É possível que o tratamento com vitaminas tenha exercido um efeito pró - oxidante em animais normoglicêmicos, mas isso não afetou negativamente o fechamento da ferida naqueles animais. Se esta hipótese é verdadeira, a quantidade de MDA não foi alterada nos animais controle, embora tenha sido reduzida após o tratamento com antioxidantes em animais diabéticos ao longo de toda a cicatrização. Como ele também é um marcador do estresse oxidativo, a melhora no nível das citocinas pode ser atribuída à redução do estresse oxidativo.

Para avaliarmos se o aumento da atividade das enzimas antioxidantes no diabético atuava sobre a peroxidação lipídica avaliamos, além do MDA, a presença de hidroperóxido lipídico (LPO), que é um produto intermediário da peroxidação lipídica (Halliwell, Gutteridge, 2012). Elevadas concentrações de LPO foram encontradas no fígado, rins e pâncreas de animais diabéticos (Prabakaran, Ashokkumar, 2012).

Surpreendentemente, não observamos diferenças no conteúdo de LPO na derme sem lesão dos animais diabéticos, quando comparados aos controles. Na derme com lesão, tanto na fase inicial quanto na fase tardia da cicatrização, a concentração de LPO estava reduzida nos diabéticos, resultado contrário ao esperado, já que outros estudos relataram um aumento de LPO nos diabéticos (Girotti, 1998; Toppo et al, 2009). É possível que a redução de LPO nestas condições estivesse relacionada à elevada atividade da enzima GPx, que é capaz de reduzir o LPO. Corroborando esta hipótese, animais controle apresentaram maior quantidade de LPO e menor atividade de GPx. Por outro lado, o tratamento com antioxidantes reduziu a atividade da GPx e catalase, sem alterar os níveis de LPO.

Estudos realizados com as vitaminas C e E utilizadas isoladamente em diferentes tecidos e células mostraram redução da peroxidação lipídica (McArdle et al., 2009). A vitamina C diminuiu o íon superóxido (Mandl et al., 2009) e inibiu o fator de transcrição AP - 1 (que exerce um papel chave na indução da apoptose); no entanto, ativou NFκ - B (fator de transcrição que aumenta a produção de citocinas) em queratinócitos submetidos ao estresse oxidativo provocado pela irradiação (Catani et al., 2005). A vitamina E, por sua vez, exerceu um efeito protetor contra a citocina pró-inflamatória TNF - α (Li et al., 2012) e melhorou a cicatrização em animais diabéticos geneticamente modificados (Galeano et al., 2001).

A suplementação associada das vitaminas E e C melhorou os níveis glicêmicos, quando associada a agentes hipoglicemiantes (Alper et al., 2006) ou mesmo sem estes agentes (Park, Lim, 2011). Conforme já mencionado, neste estudo a hiperglicemia não foi afetada pela suplementação com estas vitaminas.

Com base nos resultados apresentados, sugerimos que o tratamento com as vitaminas antioxidantes C e E via oral atuou da seguinte forma sobre a cicatrização dos animais diabéticos:

1) Reduziu o estresse oxidativo, como verificado pela redução de MDA e da atividade das enzimas antioxidantes, catalase e glutationa peroxidase;
2) Modulou o ambiente da ferida pelo aumento da atividade da glutationa redutase, que torna a glutationa disponível recuperando a homeostase na área da lesão;
3) Modulou a presença de macrófagos na área da lesão na fase final da cicatrização, o que resultou na diminuição das células inflamatórias, citocinas e recuperou o atraso na reepitelização.

Assim, podemos concluir que o tratamento sistêmico a curto prazo com as vitaminas antioxidantes melhorou a cicatrização de feridas diabéticas sem alterar a glicemia, mas melhorando o balanço redox na ferida.

Uma vez que o tratamento sistêmico apresentou resultados estimulantes, o próximo passo foi testar a aplicação de vitaminas antioxidantes num tratamento tópico. Para isso, optamos por utilizar a nanomedicina, que consiste do emprego de diferentes carreadores em escala nanométrica contendo componentes bioativos, com benefícios médicos e farmacêuticos. Tem sido muito utilizada para o tratamento de doenças do sistema nervoso central e câncer (Devalapally et al., 2007; Naahidi et al., 2013).

O tamanho da nanopartícula é importante para a sua penetração tecidual ou celular, para a liberação da carga e para a estimulação de células do sistema imunológico, em alguns casos (Borel, Sabliov, 2014; Naahidi et al., 2013). As nanopartículas lipídicas (NLs) são excelentes carreadores para as mais diversas vias de aplicação, como por exemplo a via oral, retal, parenteral, vaginal, óptica e qualquer outra aplicação tópica sobre pele ou mucosas. Também é excipiente para cosméticos (Naahidi et al., 2013). Estudos realizados para avaliar a penetração das NLs na pele sem lesão demonstraram penetração na epiderme e alcance até a derme, superior à de um creme base (Kendall, Nicolaou, 2013; Küchler et al., 2009; Lombardi et al.,2005).

As nanopartículas lipídicas (NLs) são consideradas seguras, por exibirem uma excelente tolerabilidade, uma vez que são formuladas com lipídios biodegradáveis e/ou com características fisiológicas (Pardeike et al., 2009). Mesmo assim, a nanotoxicologia tem se desenvolvido rapidamente, tendo como função avaliar a segurança e o desenvolvimento de novos nanomateriais (Crosera et al., 2009). A escolha do excipiente para a formulação das NLs é de extrema importância, pois ele confere estabilidade à partícula; dentre os diferentes lipídeos testados, os triglicerídeos têm sido considerados os mais apropriados para este fim (Radomska-Soukharev, 2007).

Desenvolvemos nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) utilizando a manteiga de cacau como excipiente, para aplicação tópica da vitamina E. A composição química da manteiga de cacau consiste de triglicerídeos, ácidos graxos saturados e insaturados e alfa - tocoferol, dependendo da origem do cacau (Beppu et al., 2013; Buchgraber et al., 2004). Embora existam poucos estudos utilizando este excipiente, um estudo com incorporação de doxorubicina revelou eficácia na redução do crescimento de

glioblastoma (Kuo, Liang,2011). O presente estudo é o primeiro associando NLSs formuladas com manteiga de cacau contendo vitamina E. Verificamos, na fase de caracterização das NLSs, a confirmação da escala nanométrica e uma excelente capacidade de encapsulação do antioxidante lipolítico, o que garante sua proteção contra agentes oxidantes externos e uma liberação lenta. As características físico - químicas, pH e viscosidade foram adequados para a aplicação na pele, além da estabilidade ao longo do tempo.

O Carpobol®UltrezTM é um polímero utilizado para dar consistência a formulações como loções, cremes e géis (Jiménez et al., 2007) e foi utilizado neste estudo nas formulações de NB e NANO VITE 2,5%. Testes de viscosidade e tamanho realizados em NLSs incorporadas ao Carbopol mostraram que as mesmas não foram afetadas pelo gel, conforme esperado (Hurler et al., 2013). O grupo gel foi utilizado como um controle adicional, embora com limitações. Embora seja um veículo inerte, o gel cria um meio úmido na superfície da ferida, o que estimula a síntese de colágeno e acelera o crescimento e migração das células epiteliais. O gel protege a ferida e proporciona alívio da dor, por manter úmidas as terminações nervosas. A camada impermeável à água e gases promove isolamento térmico e hipóxia, o que estimula a angiogênese. A inibição do crescimento bacteriano é potencializada pelo microambiente ácido promovido pela oclusão com este polímero (Jiménez et al., 2005). Um estudo utilizando aplicação de hidrogel em feridas diabéticas mostrou melhora no fechamento da ferida, mas sem alterar os níveis de MDA (Almeida et al., 2012). No presente estudo, o tratamento com o gel melhorou o fechamento da lesão, embora a análise histológica no 14º dia tenha revelado um atraso na reepitelização e no processo de cicatrização, com a persistência de vasos neoformados e células inflamatórias.

O tratamento tópico utilizando apenas as NLSs (sem vitamina E, denominada por nós “nano branco” – NB) foi suficiente para melhorar os parâmetros morfológicos e inflamatórios nas feridas de animais diabéticos na fase inicial da cicatrização. Ácidos graxos oleico e linoleico estão presentes na composição da manteiga de cacau, e diversos estudos realizados com animais suplementados com esses ácidos graxos demonstraram melhora da cicatrização nesta fase (Rodrigues et al., 2012; Kendall, Nicolaou, 2013).

No 12º dia pós - lesão, no entanto, os animais diabéticos tratados apenas com a NB ainda apresentavam persistência de células inflamatórias e atraso na

reepitelização. Interessantemente, Gasser (2008) realizou um estudo mostrando que a manteiga de cacau aumentou a quantidade de colágeno tipo I no 12ª dia pós - lesão. O presente estudo corrobora estes resultados, já que a NB melhorou a organização de colágenos fibrilares, embora não tenha favorecido o fechamento da ferida. Por outro lado, os resultados descritos na literatura são controversos e já foram relatados efeitos adversos de alguns componentes da manteiga de cacau. Por exemplo, um estudo utilizando ácido palmítico, presente em grande quantidade na manteiga de cacau, mostrou prejuízo à proliferação de fibroblastos e à síntese de colágeno (Kendall, Nicolaou, 2013).

As NLSs sólidas são excelentes carreadores para componentes ativos lipofílicos, por imobilizar os elementos ativos pela estrutura da nanopartícula, resultando em um aumento da proteção química e em uma liberação prolongada (Bilia et al., 2014). Por exemplo, NLSs com cetalpalmitado como excipiente, contendo vitamina E 5%, apresentaram boa penetrabilidade (Dingler et al., 1999). No presente estudo, na fase inicial da cicatrização, os animais diabéticos que receberam o tratamento tópico com a NANO VITE 2,5% apresentaram resultados semelhantes aos observados nos animais que receberam NB, com relação à área da ferida e níveis de citocinas. A análise histológica foi sugestiva de um aumento da celularidade, compatível com uma melhora da resposta inflamatória.

Trombino (2009) demonstrou que a aplicação de NLSs contendo alfa - tocoferol e betacaroteno reduziu a peroxidação lipídica provocada pela exposição aos raios UVA. Um resultado equivalente foi observado por nós no 12º dia pós - lesão, devido à redução de MDA na derme subjacente à lesão em animais diabéticos que receberam NANO VITE 2,5%, quando comparados aos demais grupos do estudo. A redução de MDA indica modulação do estresse oxidativo na ferida, o que pode ter contribuído para a redução do tempo de cicatrização em diabéticos tratados com a NANO VITE 2,5% de 18 para 12 dias, uma melhora de 33,3%. Observou - se também naqueles animais uma redução nos níveis das citocinas inflamatórias, reepitelização e recuperação das características da pele.

O principal componente da matriz extracelular da derme é o colágeno fibrilar do tipo I, embora outros tipos de colágenos fibrilares também estejam presentes (Ali - Bahar et al., 2004; Chalikias, Tziakas, 2014; Ottani et al., 2002). Animais diabéticos apresentam menor produção de colágenos tipos I e III na lesão (Bermudez et al., 2011; Caskey et al., 2013; Zgheib et al., 2014). Nossos resultados utilizando coloração com

Sirius Red (técnica de Picrosírius), que evidencia colágenos fibrilares, corroboram esta conclusão para a ferida no 12º dia. O tratamento tópico melhorou significativamente a produção de colágeno na ferida.

Concluímos, portanto, que o tratamento tópico de feridas cutâneas de animais diabéticos com NLSs formuladas com manteiga de cacau como excipiente contendo vitamina E 2,5% restaurou a cicatrização, melhorando os parâmetros inflamatórios, acelerando a reepitelização e estimulando a síntese de colágenos.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, sugerimos que o tratamento com as vitaminas antioxidantes C e E via oral e tratamento tópico com as nanopartículas lipídicas sólidas, atuaram das seguintes formas sobre a cicatrização dos animais diabéticos:

4) Reduziu o estresse oxidativo, como verificado pela redução de MDA e da atividade das enzimas antioxidantes, catalase e glutationa peroxidase;
5) Modulou o ambiente da ferida pelo aumento da atividade da glutationa redutase, que torna a glutationa disponível recuperando a homeostase na área da lesão;
6) Modulou a presença de macrófagos na área da lesão na fase final da cicatrização o que resultou na diminuição das células inflamatórias, citocinas e recuperou o atraso na reepitelização.

REFERÊNCIAS *

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6. ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2010; 566 p.

Abdi K. IL-12: the role of p40 versus p75. Scand J Immunol. 2002 Jul;56(1):1-11.

Adzick NS, Lorenz HP. Cells, matrix, growth factors, and the surgeon.The biology of scarless
fetal wound repair. Ann Surg. 1994 Jul;220(1):10-8.

Almeida JS et al. Hydrogels containing rutin intended for cutaneous administration: efficacy in wound healing in rats. Drug Dev Ind Pharm. 2012 Jul;38(7):792-9.

Ali - Bahar M et al. Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA. Wound Repair Regen. 2004;12(2):175-82.

Alper G et al. Effect of vitamin E and C supplementation combined with oral antidiabetic therapy on the endothelial dysfunction in the neonatally streptozotocin injected diabetic rat. Diabetes- Metab Res Reviews. 2006; 22:190-7.

Amano H et al. Impairment of endotoxin-Induced macrophage inflammatory protein 2 gene expression in alveolar macrophages in streptozotocin-induced diabetes in mice. Infect and Immun. 2000; 2925–29.

Andreea SI et al. AGEs and glucose levels modulate type I and III procollagen mRNA synthesis in dermal fibroblasts cells culture. Exp Diabetes Res. 2008;2008:473603.

Asleh R, Levy LP. Divergent Effects of alpha-Tocopherol and Vitamin C on the Generation of Dysfunctional HDL Associated with Diabetes and the Hp 2-2 Genotype. Antioxid Redo Sign. 2010;12(2):209-17.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet].Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Apuzzo MLJ, Liu CY. Things to come. Neurosurgery. 2001;49:765–78.

Apuzzo ML et al. The alchemy of ideas. Neurosurgery. 2008; 63:1035-44.

Azzi A, Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles. Progr Lipid Res. 2000;39:231-55.

Bangert et al. Immune functions of the skin. Clin Dermatol. 201;29(4):360-76.

Barnes MJ: Function of ascorbic acid in collagen metabolism. Ann NY Acad Sci. 1975; 258:264-77.

Baroni A et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. Clin Dermatol. 2012;30(3):257-62.

Beldon P. Basic science of wound healing. Surgery. 2010;28:409–12.

Beppu F et al. Quantification of triacylglycerol molecular species in cocoa butter using high-performance liquid chromatography equipped with nano quantity analyte detector. J Oleo Sci. 2013;62(10):789-94.

Bermudez DM et al. Impaired Biomechanical Properties of Diabetic Skin: Implications in Pathogenesis of Diabetic Wound Complications. Am J Pathol. 2011;178(5):2215-23.

Berdnikovs S et al. Isoforms of vitamin E have opposing. Immunoregulatory Funcitons during Inflammation by Regulating Leukocyte Recruitment. J Immunol. 2009; 182:4395– 405.

Buchgraber M et al. Cluster analysis for the systematic grouping of genuine cocoa butter and cocoa butter equivalent samples based on triglyceride patterns. J Agric Food Chem. 2004; 52(12):3855-60.

Bilia AR et al. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. Evid Based Complement Alternat Med. 2014;2014:651593.

Birlouez-Aragon I, Tessier FJ. Antioxidant vitamins and degenerative pathologies. A review of vitamin C. J Nutri Health Aging. 2003;7:103–9.

BjΦrneboe A et al. Absorption, Transport and Distribution of Vitamin E. Am Inst Nutri. 1989; 120(3):233-42.

Borel T, Sabliov CM. Nanodelivery of bioactive components for food applications: types of delivery systems, properties, and their effect on ADME profiles and toxicity of nanoparticles. Annu Rev Food Sci Technol. 2014;5:197-213.

Branka R et al. Simultaneous absorption of vitamins C and E from topical microemulsions using reconstructed human epidermis as a skin model. Eur J Pharm Biopharm. 2009; 72 (1) :69-75.

Blakytny R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. Diabetic Med. 2006;23:594–608.

Bradford, M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" Anal. Biochem. 1976;72:248-54.

Brand-Williams W, Cuvelier Me, Berset C. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technol. 1995;28:25-30.

Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. Adv Drug Deliver Rev. 2004;56(11):1649-59.

Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. J Clin Inves. 2007;117(5):1219-22.

Bickers DR, Atha M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease (Review). J Invest Dermatol. 2006;126(12):2565-75.

Brigelius-Flohe R,Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. FASEB J. 1999;13(10):1145-55.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 2001;414:813-20.

Buchanan K et al. Prevention of striae gravidarum with cocoa butter cream. Int J Gynaecol Obstet. 2010;108(1):65-8.

Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. Method Enzymol J.1985; 113:484-95.

Caskey RC et al. Dysregulation of collagen production in diabetes following recurrent skin injury: Contribution to the development of a chronic wound. Wound Repair Regen. 2014;22(4):515-20

Catani MV et al. Biological role of vitamin C in keratinocytes. Nutr Rev. 2005;63:81-90.

Ceriello A et al. Simultaneous control of hyperglycemia and oxidative stress normalizes endothelial function in type 1 diabetes. Diabetes Care. 2007;30(3):649-54.

Clifford AJ et al. A feasibility study quantifying in vivo human alpha-tocopherol metabolism. Am J of Clin Nutr. 2006;84:1430–41.

Chacon MR et al. Different TNF- α expression elicited by glucose in monocytes from type 2 diabetes mellitus patients. Atherosclerosis. 2007;194:18–25.

Chalikias GK, Tziakas DN. Biomarkers of the extracellular matrix and of collagen fragments. Clin Chim Acta. 2014; pii: S0009-8981(14)00286-1.

Chow CK. Vitamin E and oxidative stress. Free Radic Biol Med. 1991;11:215–32.

Chen Z et al. Therapeutic implications of newly identified stem cell populations from the skin dermis. Cell Transplant. 2014 Jun 26. [Epub ahead of print]

Chiarelli, F et al. Effects of vitamin E supplementation on intracellular antioxidant enzyme production in adolescents with type 1 diabetes and early microangiopathy. Pediatr Res. 2004.;56:720–5.

Caminade AM et al. Biological properties of phosphorus dendrimers. New J Chem. 2010;34:1512–24.

Cole J, et al. Early gene expression profile of human skin to injury using high-density cDNA microarrays. Wound Repair Regen. 2001;9:120-30.

Cotran RS, Robbins SL, Kumar V. Robbins phatologic basic of disease. 5 ed. Philadelphia, : Sauders Elsievier; 1994. p.51-92.

Crosera M et al. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. Int Arch Occup Environ Health. 2009;82(9):1043-55.

Cunningham JJ. Altered Vitamin C Transport in Diabetes Mellitus. Med Hypotheses. 1988; 26,263-5.

Dakhale GN et al. M. Supplementation of Vitamin C Reduces Blood Glucose and Improves Glycosylated Hemoglobin in Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized, Double-Blind Study. Adv Pharm Sci. 2011:19527.

Danaei G et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country - years and 2·7 millionparticipants. Lancet. 2011; 2;378(9785):31-40.

Davis RH et al. Vitamin C influence on localized adjuvant arthritis. J Am Podiatr Med Assoc. 1990; 80(8):414-8.

Devalapally H. Role of Nanotechnology in Pharmaceutical Product Development. J Pharm Sci. 2007; 96(10):2547-65.

Dinarello CA. Interleukin-1 and tumor necrosis factor: Effector cytokines in autoimmune diseases. Semin Immunol. 1992; 4(3):133-45.

Dingler A et al. Solid lipid nanoparticles (SLN/Lipopearls)--a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. J Microencapsul. 1999; 16(6):751-67.

Doane TL, Burda C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. Chem Soc Rev. 2012;41(7):2885-911.

Dovi JV et al. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. Journal of Leukocyte Biology. 2003; 73(4):448-55.

Donaruma LG. Definitions in biomaterials, in: D.F. Williams (Ed.), J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed., 26, Elsevier, Amsterdam, 1987, pp. 414–422.(APUD).

Duarte TL, Lunec J. Review: when is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. Free Radic Res. 2005 ; 39(7):671-86..

Duarte TL et al.Gene expression profiling reveals new protective roles for vitamin C in human skin cells. Free Radic Biol Med. 2009;46(1):78-87.

Droge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. Physiol Rev. 2002; 82(1):47-95.

Eming SA et al. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. J Invest Dermatol. 2007;127(3):514-25.

Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. Surgery. 2005; 23(1); 37- 42.

Esmaeili F et al. PLGA nanoparticles of different surface properties: preparation and evaluation of their body distribution. Int J Pharm. 2008;349(1-2):249-55.

Evans JL et al. Oxidative stress and stress activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. Endocr Rev. 2002;23(5):599-622.

Fahey III TJ et al. Diabetes Impairs the Late Inflammatory Response to Wound Healing. J Surg Res. 1991;50(4):308-13.

Cavanagh PR et al. Treatment for diabetic foot ulcers. Lancet. 2005;366(9498):1725-35.

Feldmeyer L et al. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. Curr. Biol. 2007;17:1140 - 5.

Fardoun RZ. The Use of Vitamin E in Type 2 Diabetes Mellitus. Clin Exp Hypertens. 2007; 29:135–48.

Feldmeyer L et al. Interleukin-1, inflammasomes and the skin. Interleukin-1, inflammasomes, and the skin. Eur. J. Cell Biol. 2010;89:638-44.

Feng SS. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. Expert Rev Med Devices. 2004;1(1):115-25.

Fighera M R et al. Ascorbic acid and a-tocopherol attenuate methylmalonic acid - induced convulsions. Neuroreport. 1999;10:2039 - 43.

Fischer CP et al. Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. J Physiol. 2004;558(Pt 2):633-45.

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 1984;105:114-21.

Foundation ID: Diabetes: A Global Threat Brussels. Belgium. International Diabetes Foundation. 2006, 1-15.

Fossati P et al. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. Clin Chem. 1980;26(2):227-31.

Galeano M et al. Raxofelast, a hydrophilic vitamin E-like antioxidant, stimulates wound healing in genetically diabetic mice. Surgery. 2001;129(4):467-77.

Gasser P et al. Cocoa polyphenols and their influence on parameters involved in ex vivo skin restructuring. Int J Cosmet Sci. 2008;30(5):339-45.

Gil ES, Hudson SM. Effect of Silk Fibroin Interpenetrating Networks on Swelling/Deswelling Kinetics and Rheological Properties of Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels. Biomacromolecules. 2007;8(1):258-64.

Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J Lipid Res. 1998;39(8):1529-42.

Goldner MG. Alloxan Diabetes - Its Production and Mechanism. Bull N Y Acad Med. 1945;21(1):44-55.

Gowda R et al. Use of Nanotechnology to Develop Multi - Drug Inhibitors For Cancer Therapy. J Nanomed Nanotechnol. 2013;4(6). pii: 184.

Gonzalez Y et al. High glucose concentrations induce TNF- α production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes. BMC Immunol. 2012;13:19

Goova MT et al. Blockade of Receptor for Advanced Glycation End-Products Restores Effective Wound Healing in Diabetic Mice. Am J Pathol. 2001;159(2):513-25.

Greenhalgh GD. Wound healing and diabetes mellitus. Clin Plast Surg. 2003;30(1):37-45.

Gurtner GC, Werner S. Wound repair and regeneration. Nature. 2008;453(15):314-21.

Gupta S et al. Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. Indian Dermatol Online J. 2013;4(4):267-72.

Hacquebard M, Carpentier YA. Vitamin E: absorption, plasma transport and cell uptake. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2005;8(2):133-8.

Halliwell B, Gutteridge JM (Eds): Free Radicals in Biology and Medicine. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. Free Radic Biol Med. 1992;12(1):93-5.

Halliwell B, Gutteridge JM. Free Radicals in Biology and Medicine. 4. ed. Oxford: Oxford University Press; 2007. 849 p.

Hampl JS et al. Vitamin C deficiency and depletion in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 to 1994. Am J Public Health. 2004;94(5):870-5.

Hawkes SP et al. Matrix Metalloproteinase Protocols. Methods Mol Biol. 2010;622:257-69

Hennessey PJ et al. Wound collagenase activity correlates directly with collagen glycosylation in diabetic rats. J Pediatr Surg. 1990;25(1):75-8.

Hoye AT et al. Targeting mitochondria. Acc Chem Res. 2008;41(1):87-97.

Ho E et al. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. Redox Biol. 2013;1(1):483-91.

Hong JH et al. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin - induced diabetic rats. Clin Chim Acta. 2004;340(1-2):107-15.

Howard AC et al. Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. Nat Commun. 2011;2:597.

Huebschmann AG et al. Diabetes and advanced glycoxidation end products. Diabetes Care. 2006; 29(6):1420-32.

Hurler J et al. The effect of lipid composition and liposome size on the release properties of liposomes-in-hydrogel. Int J Pharm. 2013;456(1):49-57.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/indic_sociosaude/2009/default.shtm. Acesso em: 31 jul 2014.

International Best Practice Guidelines: Wound Management in Diabetic Foot Ulcers. Wounds International, 2013.

IWGN Workshop, M. C. Roco, R. S. Williams, and P. Alivisatos. Nanotechnology Research Directions: IWGN Workshop Report : Vision for Nanotechnology R&D in the Next Decade. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000.

Inoguchi TP et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. Diabetes. 2000; 49: 1939–45.

Jalil AM, Ismail A. Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health? Molecules. 2008;13(9):2190-219.

Je HD et al. The comparison of vitamin C and vitamin E on the protein oxidation of diabetic rats. J Auton Pharmacol. 2001;21(5-6):231-6.

Jiménez MM et al. The influence of co - solvent polarity on the flow properties of hydroalcoholic els: empirical models. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2005;53(9):1097-102.

Jiménez MM et al. Rheological study of binary gels with Carbopol Ultrez 10 and hyaluronic acid. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2007;55(8):1157-63.

Johansen JS et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. Cardiovasc Diabetol. 2005;4(1):5.

Jaganjac M et al. Reactive aldehydes - second messengers of free radicals in diabetes mellitus. Free Radic Res. 2013;47 Suppl 1:39-48.

Kamal - Eldin A, Appelqvist LA. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. Lipids. 1996; 31:671-701.

Keller KL, Fenske NA. Uses of vitamins A, C, and E and related compounds in dermatology: A review. J Am Acad Dermatol. 1998;39(4 Pt 1):611-25.

Kendall AC, Nicolaou A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. Prog Lipid Res. 2013;52(1):141-64.

Komesu MC et al. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. Pathophysiology. 2004; 11(2):63–7.

Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. Expert Rev Mol Med. 2011;13:e23.

Küchler S et al. Nanoparticles for skin penetration enhancement--a comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter andsolid lipid nanoparticles. Eur J Pharm Biopharm. 2009;71(2):243-50.

Kuo YC, Liang CT. Catanionic solid lipid nanoparticles carrying doxorubicin for inhibiting the growth of U87MG cells. Colloids Surf B Biointerfaces. 201;85 (2):131-7.

Lai-Cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails. Medicine 2013;41(6):317–20.

Lamers ML et al. High-glucose mediated oxidative stress impairs cell migration. PloSone. 2011;6(8):e22865.

Lavanya G et al. Acetone Extract from Rhodomyrtus tomentosa: A Potent Natural Antioxidant. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:535479.

Lee JL et al. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. Toxicology and Applied Pharmacology. 2003;192:294–306.

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin - induced diabetes. Diabetologia. 2008;51(2):216-26.

Levine M et al. Criteria and recommendations for vitamin C intake. JAMA. 1999; 281:1415 -23.

Li CJ et al. Alpha-Tocopherol Alters Transcription Activities that Modulates Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α) Induced Inflammatory Response in Bovine Cells. Gene Regul Syst Bio. 2012;6:1-14.

Li RK et al. Effect of vitamin E on human glutathione peroxidase (GSH-PX1) expression in cardiomyocytes. Free Radic Biol Med. 1996;21(4):419-26.

Licciardi M et al. New self-assembling polyaspartylhydrazide copolymer micelles for anticancer drug delivery. International Journal of Pharmaceutics. 2010; 396(1–2):219–28.

Lima CC et al. Ascorbic acid for the healing of skin wounds in rats. Braz J Biol. 2009;69(4):1195-201.

Lima MHM et al. Topical Insulin Accelerates Wound Healing in Diabetes by Enhancing the AKT and ERK Pathways: A Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. PLoS ONE. 2012; 7(5): e36974.

Linster CL, Schaftingen EV. Vitamin C Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. FEBS J. 2007;274(1):1-22.

Lobmanna R et al. Expression of matrix metalloproteinases and growth factors in diabetic foot wounds treated with a protease absorbent dressing. J Diabetes Complications. 2006;20(5):329-35.

Lombardi Borgia S et al. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement-correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and parelectric spectroscopy. J Control Release. 2005;110(1):151-63.

McNeil SE. Nanotechnology for the biologist. J Leukoc Biol. 2005;78(3):585-94.

Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. J Invest Dermatol. 2003;121(2):231-41.

Lowry SF, MD. Cytokine Mediators of Immunity and Inflammation. Archives of Surgery. 1993;128(11):1235-1241.

Mahdavian Delavary B et al. Macrophages in skin injury and repair. Immunobiology. 2011;216(7):753-62.

Mandl J et al. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. Br J Pharmacol. 2009;157(7):1097-110.

Marcil et al. Analysis of the effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage, antioxidant response and inflammation in THP-1 macrophages. Clin Biochem. 2011;44(10-11):873-83.

Maritim AC et al. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. J Biochem Mol Toxicol. 2003;17(1):24-38.

Martin A et al. Abnormal Angiogenesis in Diabetes Mellitus. Med Res Rev. 2003; 23(2):117-45.

Martin A et al. Rheology in physical pharmacy. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. 622 p.

Martin P et al. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. Science. 1997;276:75-8.

Mascarenhas MN et al. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. PLoS Med. 2012; 9(12): e1001356.

Mattila TK, de Boer A. Influence of Intensive versus Conventional Glucose Control on Microvascular and Macrovascular Complications in Type 1 and 2 Diabetes Mellitus. Drugs. 2010 Dec 3;70(17):2229-45.

May JM et al. Ascorbate uptake and antioxidant function in peritoneal Macrophages. Arch Biochem Biophys. 2005;440(2):165-72.

McCary CA et al. Vitamin E isoforms directly bind PKCα and differentially regulate activation of PKCα. Biochemical Journal. 2011; 441(1):189-98.

McCay PB. VITAMIN E: Interactions with Free Radicals and Ascorbate. Annu Rev Nutr. 1985;5:323-40.

McArdle F et al. UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: effects of oral vitamin C supplementation. Free Radic Biol Med. 2002;33(10):1355-62.

Medical Advisory Secretariat. Nanotechnology: an evidence-based analysis. Ontario Health Technology Assessment Series 2006; 6(19).

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. 2008;454(7203):428-35

Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. Adv Drug Deliv Rev. 2001;47(2-3):165-96.

Menke NB, Diegelmann RF. Impaired wound healing. Clin Dermatol. 2007 Jan-Feb;25(1):19-25.

Mirza R, Koh TJ. Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. Cytokine. 2011;56(2):256-64.

Miao M et al. Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: A possible pathophysiologic correlation. Wound Repair Regen. 2012;20(2):203-13.

Mora-Huertas CE et al. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. Int J Pharm. 2010;385(1-2):113-42

Mukai K et al. Stopped-flow investigation of the reaction of vitamin C with tocopheroxyl radical in aqueous triton X-100 micellar solutions. The structure–activity relationship of the regeneration reaction of tocopherol by vitamin C. J Biol Chem. 1991;266(1):274-8.

Müller RH et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2000;50(1):161-77.

Müller RH et al. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. Adv Drug Deliv Rev. 2007;59(6):522-30.

Mursu J et al. Dietary supplements and mortality rate in older women: The Iowa Women’s Health Study. Arch Intern Med. 2011;171(18):1625-33

Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. Trends Genet. 2004;20(1):33-43.

Naahidi S et al. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. J Control Release. 2013;166(2):182-94.

Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. Nutr J. 2003;2:7.

National Research Council. Recommended dietary allowances. 10th ed.Washington, DC: National Academy Press, 1989.

Niki E et al. Interaction among vitamin C, vitamin E and beta-carotene. Am J Clin Nutr. 1995;62(6 Suppl):1322S-26S.

Niki E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. Free Radic Biol Med. 2009;47(5):469-84.

Niki E. Interaction of Ascorbate and a-Tocopherol. Ann N Y Acad Sci. 1981; 206(1):173-80.

Nurten Aksoy T et al. Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats. Nutr Res. 2005; 25:625–30.

Ochoa O et al. Chemokines and Diabetic Wound Healing. Vascular. 2007;15(6):350 – 55.

Onoue S et al. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. Int J Nanomedicine . 2014;9:1025-37.

Ole P. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and Diabetes The Good, the Bad, or the Indifferent?. Diabetes. 2005; 54(supl 2): 114-24.

Ottani V et al. Hierarchical structures in fibrillar collagens. Micron. 2002;33(7-8):587-96.

Park NY, LimY. Short term supplementation of dietary antioxidants selectively regulates the inflammatory responses during early cutaneous wound healing in diabetic mice. Nutr Metab. 2011; 8(1):80.

Padayatty SJ, Levine M. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. CMAJ. 2001;164(3):353-5.

Papazoglou ES et al. Image analysis of chronic wounds for determining the surface area. Wound Repair Regen. 2010;18(4):349-58.

Pardeike J et al. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. Int J Pharm. 2009;366(1-2):170-84.

Pazdro R, Burgess JR. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. Mech Ageing Dev. 2010;131(4):276-86

Penfornis A et al. Evolution of devices in diabetes management. Diabetes Technol Ther. 2011;13 Suppl 1:S93-102.

Pereira GG et al. Microparticles of Aloe vera/vitamin E/chitosan: microscopic, a nuclear imaging and an in vivo test analysis forburn treatment. Eur J Pharm Biopharm. 2014;86(2):292-300.

Pérez-Matute P, Zulet MA, Martínez JA. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. Curr Opin Pharmacol. 2009;9(6):771-9.

Pierce GF. Inflammation in nonhealing diabetic wounds: the space-time continuum does matter. Am J Pathol. 2001;159(2):399-403.

Prabakaran D, Ashokkumar N. Protective effect of esculetin on hyperglycemia-mediated oxidative damage in the hepatic and renal tissues of experimental diabetic rats. Biochimie. 2013;95(2):366-73

Puri A et al. Lipid - based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2009;26(6):523-80.

Radomska-Soukharev A. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. Adv Drug Deliv Rev. 2007;59(6):411-8.

Rafehi H et al. Genetic and epigenetic events in diabetic wound healing. Int Wound J. 2011;8(1):12-21

Rajasekarana NS et al. The effect of finger millet feeding on the early responses during the process of wound healing in diabetic rats. Biochim Biophys Acta. 2004;1689(3):190-201.

Roep BO et al. Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 in insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet. 1994; 45(9):809-19.

Rose RC. Water-Soluble Vitamin Absorption in Intestine. Annu Rev Physiol. 1980;42:157-71.

Rodero MP, Khosrotehrani K. Skin wound healing modulation by macrophages. Int J Clin Exp Pathol. 2010 Jul 25;3(7):643-53.

Rodrigues HG et al. Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing. J Invest Dermatol 2012;132:208–15.

Rosenberg CS. Wound Healing in the patient with diabetes mellitus. Nurs Clin North Am. 1990;25(1):247-61.

Sander CS et al. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. Int J Dermatol. 2004;43(5):326-35.

Sharma AK, Khanna D. Diabetes mellitus associated cardiovascular signaling alteration: a need for the revisit. Cell Signal. 2013;25(5):1149-55.

Sarisözen B et al. The Effects of Vitamins E and C on Fracture Healing in Rats. J Int Med Res. 2002;30(3):309-13.

Sato YT et al. Regulatory role of endogenous interleukin - 10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. Biochem Biophys Res Commun. 1999;265(1):194-9.

Sen CK, Roy S. Redox signals in wound healing. Biochim Biophys Acta. 2008;1780(11):1348 - 61.

Schaffazick SR et al. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. Int J Pharm. 2005;289(1-2):209-13

Schäfer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. Pharmacol Res. 2008;58(2):165-71.

Schurmann C et al. Role of wound macrophages in skin flap loss or survival in an experimental diabetes model. Br J Surg. 2010 Sep;97(9):1437-51.

Scott JA, King GL. Oxidative Stress and Antioxidant Treatment in Diabetes. Ann N Y Acad Sci. 2004;1031:204-13.

Seitz O et al. Wound Healing in Mice with High-Fat Diet- or ob Gene-Induced Diabetes-Obesity Syndromes: A Comparative Study. Exp Diabetes Res. 2010;2010:476969.

Semete B et al. In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. Nanomedicine. 2010;6(5):662-71

Sen KC, Khanna S, Roy S. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. Life Sci. 2006;78(18):2088-98.

Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. J Cell Sci. 2009;122(Pt 18):3209-13.

Shukla A, et al. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defense enzymes in a healing cutaneous wound. Free Radic Res. 1997;26(2):93-101.

Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, a-carotene, and other carotenoids as antioxidants. Am J Clin Dermatol. l995:62(suppl):l3l5S-2l5.

Son DS et al. Keratinocyte Chemoattractant (KC)/Human Growth-Regulated Oncogene (GRO) Chemokines and Pro-Inflammatory Chemokine Networks in Mouse and Human Ovarian Epithelial Cancer Cells. Cancer Biol Ther. 2007; 6(8):1302-12.

Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. J Cell Sci. 2004. 117:667-75.

Spanheimer RG et al. Decreased collagen production in diabetic rats. Diabetes. 1988; 37(4): 371–76.

Stecová J et al. Cyproterone acetate loading to lipid nanoparticles for topical acne treatment: particle characterisation and skin uptake. Pharm Res. 2007;24(5):991-1000.

Strom A et al. Pronounced reduction of cutaneous Langerhans cell density in recently diagnosed type 2 diabetes. Diabetes. 2014;63(3):1148-53.

Tahan G et al. Vitamin E has a dual effect of anti-inflammatory and antioxidant activities in acetic acid–induced ulcerative colitis in rats. Can J Surg. 2011;54(5):333-8.

Tanaka K et al. Interactions between Vitamin C and Vitamin E Are Observed in Tissues of Inherently Scorbutic Rats. J Nutr. 1997;127(10):2060-4.

Toma JG et al. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. Stem Cells. 2005;23(6):727-37.

Toppo S et al. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme. Biochim Biophys Acta. 2009;1790(11):1486-500.

Traber MG, Stevens JF. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. Free Radic Biol Med. 2011;51(5):1000-13.

Trenam CW et al. Skin inflammation: reactive oxygen species and the role of iron. J Invest Dermatol. 1992;99(6):675-82.

Trombino S et al. Stearyl ferulate-based solid lipid nanoparticles for the encapsulation and stabilization of beta-carotene and alpha-tocopherol. Colloids Surf B Biointerfaces. 2009; 72 (2) :181-7.

Tsilibary EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. J Pathol. 2003;200(4):537-46.

Tsukaguchi H et al. A family of mammalian Na+-dependent L-ascorbic acid transporters. Nature 1999;399:70-5.

Uchida T et al. Tissue distribution of vitamin E metabolites in rats after oral administration of tocopherol or tocotrienol. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2011;57(5):326-32.

.Ulbrich W, Lamprecht A. Targeted drug- delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases. J R Soc Interface. 2010;7 Suppl 1:S55-66.

Ukeda H et al. Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by intermediates of Maillard reaction and glycolytic pathway and some sugars. Biosci Biotechnol Biochem. 1997;61(12):2039-42.

Vaday GG et al. Combinatorial signals by inflammatory cytokines and chemokines mediate leukocyte interactions with extracellular matrix. J Leukoc Biol. 2001;69(6):885-92.

Valacchi G et al. Emerging topics in cutaneous wound repair. Ann N Y Acad Sci. 2012;1259:136-44.

Venus M et al. Basic physiology of the skin. Surgery. 2010; 28:469 - 72.

Vicker MH. Early Life Nutrition, Epigenetics and Programming of Later Life Disease. Review. Nutrients. 2014; 6(6): 2165-78.

Xu F et al. Abnormal cell responses and role of TNF-α in impaired diabetic wound healing. Biomed Res Int. 2013;2013:754802.

Zatalia SR, Sanusi H. The role of antioxidants in the pathophysiology, complications, and management of diabetes mellitus. Acta Med Indones. 2013;45(2):141-7.

Zgheib C et al. Targeting Inflammatory Cytokines and Extracellular Matrix Composition to Promote Wound Regeneration. Adv Wound Care (New Rochelle). 2014;3(4):344-55.

Zhu P et al. Impairment of human keratinocyte mobility and proliferation by advanced glycation end products-modified BSA. Arch Dermatol Res. 2011;303(5):339-50.

Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. Prog Lipid Res. 1999;38(4):309-36.

Wang XN et al. A Three-Dimensional Atlas of Human Dermal Leukocytes, Lymphatics, and Blood Vessels. J Invest Dermatol. 2014;134(4):965-74.

Wagener FADTG et al. Targeting the Redox Balance in Inflammatory Skin Conditions. Int J Mol Sci. 2013;14(5):9126-67.

Werner S, et al. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. J Invest Dermatol. 2007;127(5):998-1008.

Wetzler C et al. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. J Invest Dermatol. 2000;115:245–53.

World Healtth organization (WHO). Disponível em: http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/. Acesso em : 31 jul. 2014.

Wiersma JJ et al. Diabetes Mellitus type 2 is associated with higher levels of myeloperoxidase. Med Sci Monit. 2008;14(8):CR406-10.

Wilkinson JB, Moore RJ. Cosmetologia de Harry Madrid: Ediciones Diaz de Santos S.A. 1039 p., 1990.

Wysocki JB et al. The influence of thymus extracts on the chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils (PMN) from patientes with insulin-dependent diabetes mellitus (IDD). Thymus. 1992;20(1):63-7.

Yach D, Stuckler D, Brownell KD. Epidemiologic and economic consequences of theglobal epidemics of obesity and diabetes. Nat Med. 2006;12(1):62-6.

Yuen A et al. Methylglyoxal-modified collagen promotes myofibroblast differentiation. Matrix Biol. 2010;29(6):537-48.