

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

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 topicalmente (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 -1 β , 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 - 1 β , 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 Picosirius 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 reepithelialization 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.

1 INTRODUÇÃO

2.01.1 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 (Penornis 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; Penornis et al., 201; Tsilibary, 2003). Algumas destas complicações, a longo prazo, podem ser fatais.

3.01.2 A Pele

A pele é o maior órgão do organismo (pode recobrir uma superfície de cerca de 2 m²), 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)

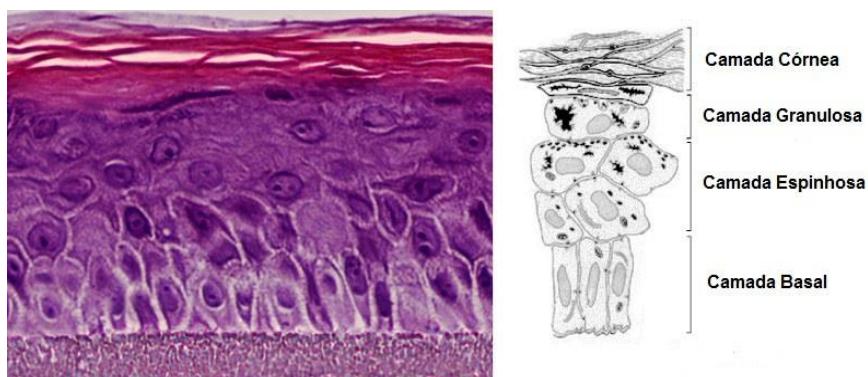


Figura 1 - Epiderme humana reconstruída e desenho esquemático das camadas celulares correspondentes. Modelo altamente diferenciado de epiderme humana, criocorte (8 µm, H & E coloração) após 14 dias em cultura na interfase no ar-líquido (à esquerda).

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 tátteis e de pressão. (Venus, Waterman 2010).

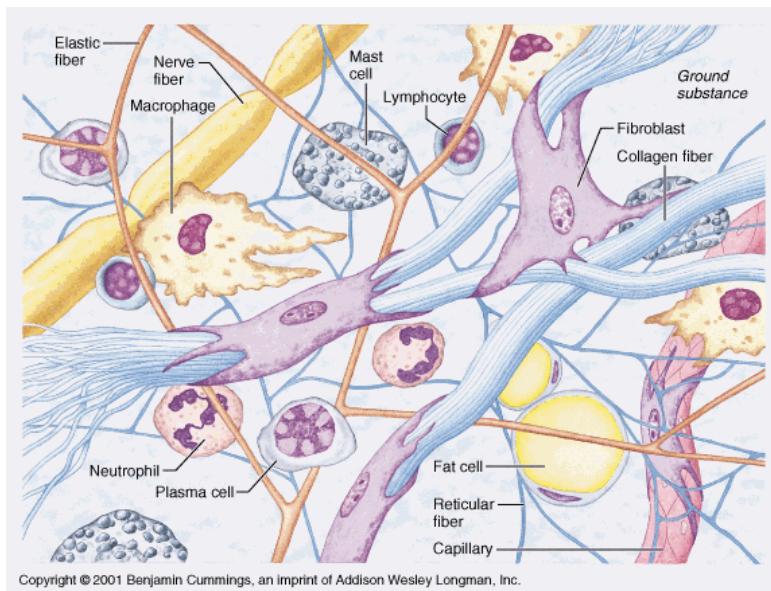


Figura 2 - Esquema da derme e seus componentes. Esquema apresentando as diversas células da derme como neutrófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, fibroblastos e estruturas capilares, fibras colágenas.

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).

4.01.3 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 - 1 β e o Fator de Necrose Tumoral - α (TNF - α). Estas citocinas atuam como mediadores da ativação do fator de transcrição NF κ B 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 5º 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).

5.01.4 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 úlcera 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).

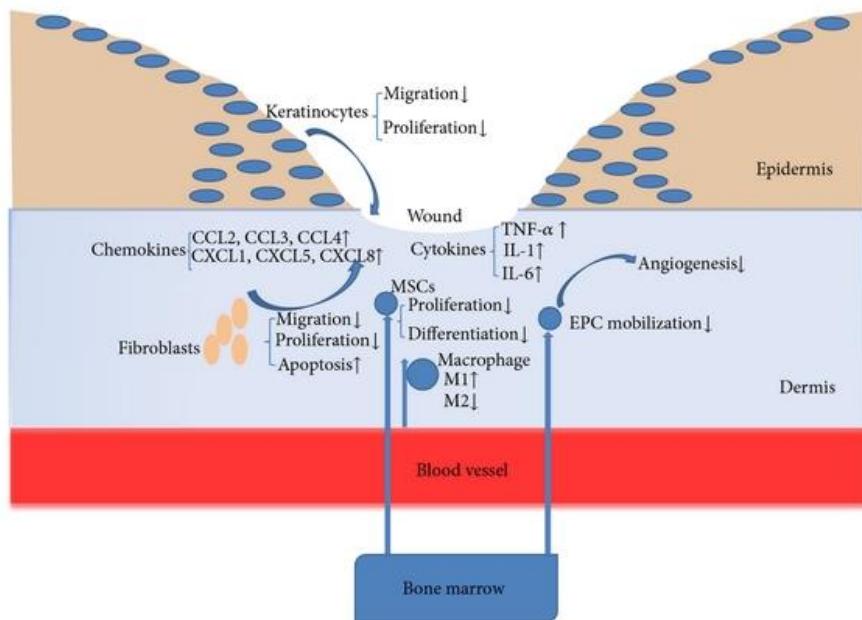


Figura 3 - Esquema do processo de cicatrização prejudicada em feridas diabéticas. No diabetes, as citocinas inflamatórias e quimiocinas estão aumentadas, tais como o TNF - α , IL - 1, IL - 6, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL5, e CXCL8. Os processos celulares afetados pela diabetes incluem migração anormal 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).

6.0 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 específicas 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).

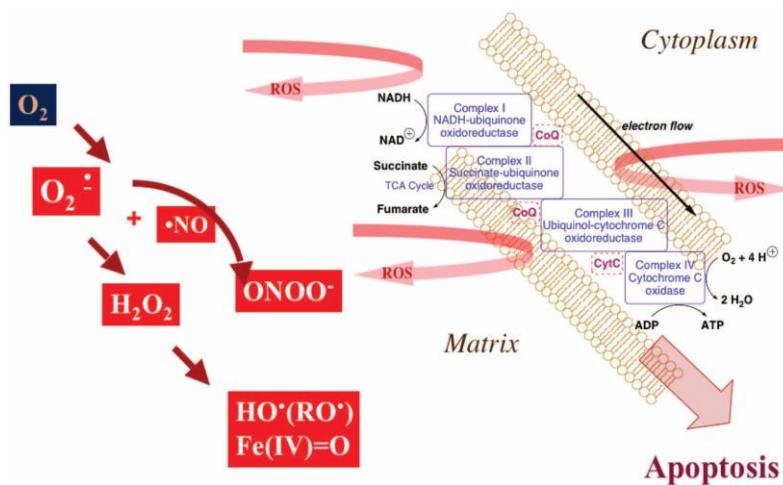


Figura 4 - Modelo esquemático para a geração de EROs e ERNs, durante a fosforilação oxidativa na membrana e matriz mitocondrial. A formação do anion superóxido inicia um processo de cascata que pode induzir a morte celular programada (apoptose). Fonte: Hoye et al., 2008.

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 - inflamatórios 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 NF_κB 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).

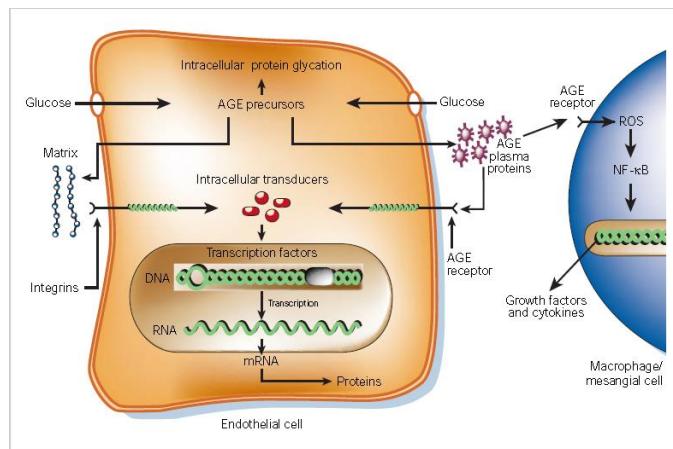


Figura 5 - Os mecanismos pelos quais produção intracelular dos Precursors dos AGEs promovem danos à célula endotelial. Proteínas da matriz extracelular modificadas, pelas AGEs, interagem com outras proteínas da matriz extracelular e com integrinas. Modificações das proteínas do plasma por precursores 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).

7.01.6 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).

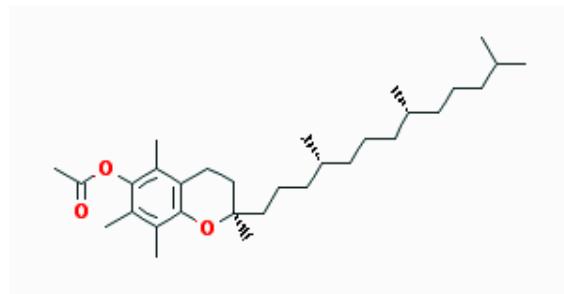


Figura 6 - Estrutura química do Acetato de Vitamina E.

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, Stocker, 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).

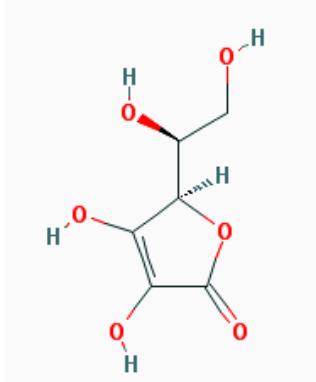


Figura 7- Estrutura química do Ácido Ascórbico.

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. É 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.

8.01.7 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).

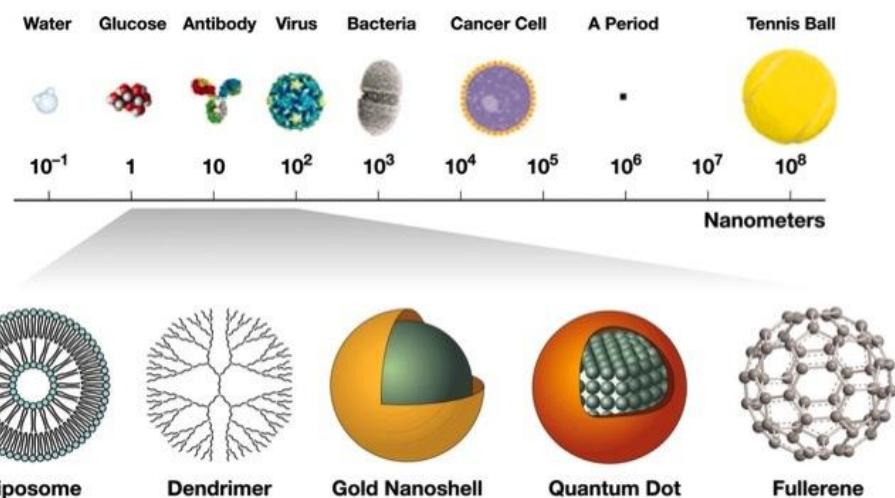


Figura 8 - Tamanho relativo das nanopartículas comparadas a itens comuns.

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 clínica 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, nanos cristais, *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 nanoplipomersomes 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 fagocíticas 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 irá 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).

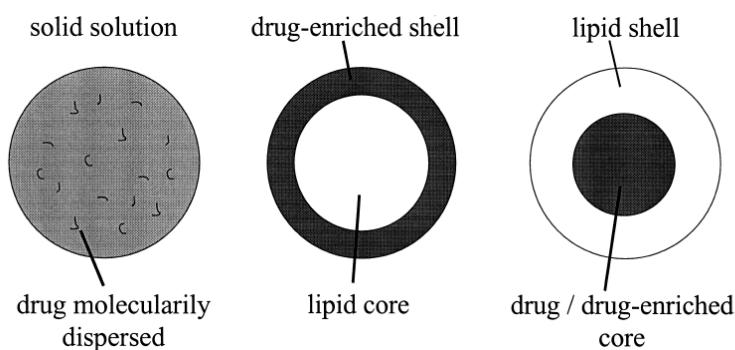


Figura 9 - Três modelos de incorporação de medicamentos pelas NLSs. Modelo de solução sólida (esquerda); 2. Modelo invólucro enriquecido com drogas, com matriz lipídica (centro); 3. Modelo invólucro lipídico, com a droga enriquecendo a matriz (direita). Fonte: Muller et al. (2000).

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 à 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).

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:

- 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.

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 Redox 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*. 2011;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 Functions 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.
- Bjørneboe 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 pathologic basic of disease. 5 ed. Philadelphia, : Saunders 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 million participants. *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 α-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 glycation 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_sociosaudade/2009/default.shtml. 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 and solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71(2):243-50.

Kuo YC, Liang CT. Cationic 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. *PLoS One*. 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 poly(aspartylhydrazide) 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 PKC α and differentially regulate activation of PKC α . 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 α-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

Penifornis 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 for burn 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.* 1995;62(suppl):I31S-215.

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 Scorbucic 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 Health 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 patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDM). *Thymus.* 1992;20(1):63-7.

Yach D, Stuckler D, Brownell KD. Epidemiologic and economic consequences of the global 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.