

Cicatrização de Feridas: O Fisiológico e o Patológico

Wound Healing: The Physiologic and the Pathologic

E. C. Leal^{1,2}, E. Carvalho^{1,2,3}

1- Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

2- Grupo de Investigação Fundamental e Translacional (GIFT) da Sociedade Portuguesa de Diabetologia, Lisboa, Portugal

3- Associação Protetora dos Diabéticos de Portugal, Lisboa, Portugal

Resumo

A cicatrização de feridas é um processo biológico complexo que tem que passar por quatro fases de forma precisa e altamente programada: hemostase, inflamação, proliferação e remodelação. Para uma ferida curar com sucesso, as quatro fases devem ocorrer numa sequência ordenada e no tempo adequado. Muitos fatores podem interferir com uma ou mais fases do processo, levando a uma cicatrização inadequada ou deficiente. Este artigo faz a revisão da literatura recente sobre os fatores e os mecanismos celulares e/ou moleculares envolvidos na cicatrização de feridas cutâneas. Entre estes fatores é dada uma particular atenção à influência da diabetes na dificuldade de cicatrização cutânea. Uma melhor compreensão da influência desses fatores na reparação de tecidos pode levar a terapias que melhoram a cicatrização de feridas crónicas.

Abstract

Wound healing is a complex biological process that involves four precisely and highly programmed phases: hemostasis, inflammation, proliferation, and remodeling. All phases must occur sequentially and in a timely manner for a successful wound to heal. Several factors can interfere with one or more phases of this process and lead to improper or impaired wound healing. This article reviews the recent literature on the factors and the cellular and/or molecular mechanisms involved in cutaneous wound healing. These factors include the effect of diabetes in impaired wound healing. A better understanding of the influence of these mechanisms on tissue repair may lead to therapeutics that improve the impaired wound healing.

> 1. INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização de feridas consiste em quatro fases altamente integradas e que se sobrepõem: hemostase, inflamação, proliferação e remodelação⁽¹⁾ do tecido. Estas fases devem ocorrer na sequência correta, num momento específico, e continuar por um período determinado. Há muitos fatores que podem afetar a cicatrização de feridas, que interferem com uma ou mais fases neste processo, causando, assim, uma reparação inadequada do tecido.

As feridas com dificuldade em cicatrizar geralmente não progridem através do processo normal de cura. Estas feridas entram frequentemente num estado de inflamação patológica devido a um processo de cicatrização pro-

longado, incompleto ou descoordenado. A maioria das feridas crónicas são úlceras que estão associadas a isquémia, a diabetes *mellitus*, a doença venosa, ou a pressão. Vários estudos têm produzido um vasto conhecimento sobre a cicatrização normal e deficiente de feridas. Do mesmo modo, muito tem sido estudado sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos fatores críticos que influenciam a má cicatrização das feridas. Embora ainda haja muito para ser esclarecido, estes estudos podem levar a terapias que promovam a reparação tecidual adequada e melhorar a cicatrização deficiente de feridas. Esta revisão discutirá vários fatores que afetam a cicatrização de feridas cutâneas e os possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos.

> 2. PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico, que consiste em quatro fases contínuas, que se sobrepõem, e que são rigorosamente programadas. Qualquer fator que cause interrupção, alteração, ou prolongamento do processo pode levar a uma cicatrização prolongada ou

CORRESPONDÊNCIA

Ermelindo C. Leal
Centro de Neurociências e Biologia Celular
Universidade de Coimbra
Rua Larga
Faculdade de Medicina, Pólo I, 1º Piso
3004-504 Coimbra

uma ferida crónica sem capacidade de cicatrizar. A cicatrização de ferida ideal envolve a sequência dos eventos: (1) hemóstase rápida; (2) inflamação; (3) diferenciação de células mesenquimais, proliferação e migração para o local da ferida; (4) angiogénese; (5) re-epitelização; e (6) síntese adequada e alinhamento de colagénio para proporcionarem resistência ao tecido de cicatrização [2-4]. A primeira fase da hemostase começa imediatamente após o ferimento, com a constrição vascular e a formação do coágulo de fibrina. O coágulo e o tecido circundante libertam citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento transformador (TGF)- β , o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento da epiderme (EGF). Após controlo da hemorragia, as células inflamatórias migram para o local da ferida (quimiotaxia) e promovem a fase inflamatória, a qual é caracterizada pela infiltração sequencial de neutrófilos, macrófagos e linfócitos [4,5]. A função dos neutrófilos é crítica uma vez que têm a função de eliminar os micróbios invasores e os restos celulares na área da ferida, embora estas células também produzam substâncias como proteases e espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam algum dano adicional. Os macrófagos desempenham vários papéis na cicatrização de feridas. Numa fase inicial, os macrófagos libertam citocinas que promovem a resposta inflamatória, recrutando e ativando leucócitos adicionais. Estes macrófagos são designados por pró-inflamatórios, ou M1, e são responsáveis por induzir e limpar as células em apoptose (incluindo neutrófilos), abrindo assim o caminho para a resolução da inflamação. Numa fase mais adiantada da cicatrização das feridas, os macrófagos passam por uma transição fenotípica a um estado reparador que estimula os queratinócitos, os fibroblastos e a angiogénese para promover a regeneração do tecido [6-8]. Estes macrófagos são designados de reparadores, ou M2, e promovem a transição para a fase proliferativa da cura da ferida.

Os linfócitos T migram para o local das feridas com as células inflamatórias e macrófagos, e essa migração é máxima durante a fase final proliferativa ou fase inicial de remodelação. Vários estudos sugerem que a infiltração tardia de células T, juntamente com a diminuição da concentração de células T no local da ferida, se associa a uma deficiente cura da ferida. Outros estudos descrevem que as células T CD4+ (células T-auxiliares) têm um papel positivo na cicatrização de feridas e as células CD8+ (células T-citotóxicas) desempenham um papel inibitório na cicatrização de feridas [9,10]. Curiosamente, estudos feitos em murganhos deficientes em ambas células T e

células B, demonstraram que a formação da cicatriz está diminuída na ausência de linfócitos [11]. Além disso, as células dendríticas da pele regulam muitos aspetos da cicatrização de feridas, incluindo a manutenção da integridade do tecido, a proteção contra agentes patogénicos, e a regulação da inflamação. Estas células são ativadas por queratinócitos em *stress* ou danificados e produzem o fator de crescimento de fibroblastos 7 (FGF-7), o fator de crescimento dos queratinócitos (KGF), e o fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1), para suportar a proliferação dos queratinócitos e a sobrevivência das células. As células dendríticas também geram quimiocinas e citocinas que contribuem para a iniciação e regulação da resposta inflamatória durante a cicatrização de feridas. Esta comunicação entre as células dendríticas e os queratinócitos é essencial para a manutenção de uma pele normal e para a cicatrização de feridas. Em murganhos com deficiência nas células dendríticas verificou-se um atraso no fecho da ferida e uma diminuição na proliferação de queratinócitos no sítio da ferida [12,13].

A fase proliferativa normalmente segue e sobrepõe-se parcialmente à fase inflamatória, sendo caracterizada pela proliferação e migração epitelial sobre a matriz provisória no interior da ferida (re-epitelização). Na reparação da derme, os tipos de células mais proeminentes são os fibroblastos e as células endoteliais. Estas células são responsáveis pelo suporte da proliferação dos capilares, pela formação de colagénio e pela formação de tecido de granulação, no local da lesão. Dentro do leito da ferida os fibroblastos produzem colagénio, bem como os glicosaminoglicanos e proteoglicanos que são os principais componentes da matriz extracelular (ECM). Após a proliferação robusta e síntese da ECM, a cicatrização de feridas entra na fase de remodelação final, que pode durar meses e até anos. Nesta fase, ocorre a regressão de muitos dos capilares recém-formados, de modo que a densidade vascular da ferida volte ao normal. Uma característica essencial da fase de remodelação é a reorganização da ECM para uma arquitetura que se aproxima do tecido normal. A ferida também sofre contração física ao longo de todo o processo de cicatrização da ferida, mediada por fibroblastos especializados, miofibroblastos (contráteis), que existem na ferida [4]. No entanto, esta contração física da ferida contribui em pequena percentagem para o fecho da ferida, ao contrário do que acontece nos murganhos onde a contração contribui significativamente para o fecho da ferida.

O papel das células estaminais (SC) na cicatrização de feridas cutâneas e regeneração de tecidos é um tema de interesse crescente, com foco sobre o papel das células estaminais adultas, como as células estaminais da epi-

derme e das células derivadas da medula óssea (BMDCs). As células estaminais epidérmicas encontram-se na área da protuberância dos folículos pilosos e na camada basal da epiderme, e dão origem aos queratinócitos que migram e permitem a re-epitelização das feridas. As BMDCs também vão desempenhar um importante papel na pele normal. Existem duas populações principais de células estaminais presentes na medula óssea (BM): SC hematopoiéticas (HSC) e SC mesenquimais (MSC). As BM-MSCs são capazes de se diferenciar numa variedade de tipos celulares, incluindo osteoblastos, adipócitos, condrócitos, fibroblastos e queratinócitos [14,15]. As células progenitoras endoteliais (EPCs) derivadas da linhagem de células HSC têm um importante papel e contribuem para a reparação e neovascularização dos capilares. Ambas células BM-MSCs e EPCs estão envolvidas no processo de cicatrização de feridas cutâneas. A hipoxia induzida pela ferida provoca a mobilização de EPCs da medula óssea para a circulação, que tem um papel importante no processo de neovascularização [15-17].

Vários tipos de células estão envolvidos no processo de cicatrização de feridas e, como descrito acima, as funções de qualquer tipo de célula pode variar durante as diferentes fases da cura da ferida. A complexidade e a coordenação do processo de cura são os principais obstáculos para as abordagens terapêuticas, uma vez que qualquer terapêutica deve ser efetivamente utilizada para a fase apropriada.

> 3. FATORES QUE INFLUENCIAM A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Vários fatores podem levar a uma deficiente cicatrização de feridas. Alguns fatores são locais, como a oxigenação e a infeção, outros fatores são sistémicos e estão relacionados com o estado geral do indivíduo, como a idade, diabetes, obesidade, nutrição. No entanto, estes fatores estão interligados uma vez que os fatores sistémicos alteram os fatores locais e influenciam a capacidade de cura das feridas.

3.1. Oxigenação

O oxigénio é importante para o metabolismo celular, especialmente para a produção de energia na forma de ATP, e é crítico para quase todo o processo de cicatrização de feridas. O oxigénio previne as feridas de infeções, induz a angiogénese, promove a diferenciação, a migração e a re-epitelização dos queratinócitos, aumenta a proliferação de fibroblastos e a síntese de colagénio, e promove a contração da ferida [18]. Além disso, o nível de produção de ião superóxido (essencial para matar agen-

tes patogénicos) por leucócitos polimorfonucleares é dependente dos níveis de oxigénio.

A falta de vascularização e o alto consumo de oxigénio pelas células metabolicamente ativas originam, inicialmente na ferida, um microambiente com falta de oxigénio, isto é, um ambiente de hipoxia. Certos fatores sistémicos, como a idade avançada e a diabetes, podem diminuir o fluxo vascular periférico, originando uma deficiente oxigenação do tecido. No contexto da cura, esta sobreposição de uma reduzida perfusão cria uma ferida isquémica. As feridas crónicas são isquémicas, a tensão de oxigénio no tecido, medida por via transcutânea, em feridas crónicas é de 5 a 20 mm de Hg, em contraste com os valores de controlo de tecido que são de 30 a 50 mm de Hg [18-20]. Em feridas onde a oxigenação não é restabelecida há maior dificuldade na cura. Após a lesão, existe uma hipoxia temporária que provoca a cicatrização de feridas, mas tempos prolongados de hipoxia dão origem a feridas crónicas [18,20]. Em feridas agudas, a hipoxia serve como um sinal que estimula muitos aspetos do processo de cicatrização de feridas. A hipoxia estimula a produção de citocinas e fatores de crescimento em macrófagos, queratinócitos e fibroblastos. As citocinas que são produzidas em resposta à hipoxia incluem PDGF, TGF- β , VEGF, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e endotelina-1, e são cruciais na promoção da proliferação de células, da migração, e da angiogénese na cicatrização da ferida [18,20]. Em feridas normais, supõe-se que as espécies reativas de oxigénio, como o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e o ião superóxido (O²⁻), agem como mensageiros celulares para estimular os processos essenciais associados com cicatrização de feridas, incluindo a motilidade celular, a ação de citocinas (incluindo a transdução de sinal do PDGF) e a angiogénese.

Em resumo, o nível de oxigénio adequado é crucial para a cicatrização ideal de feridas. A hipoxia estimula a cicatrização de feridas, assim como a liberação de fatores de crescimento e a angiogénese, enquanto o oxigénio é necessário para sustentar o processo de cicatrização. Uma opção terapêutica que às vezes pode superar a influência da hipoxia tecidual é oxigenoterapia hiperbárica (OHB) [18]. Embora a OHB possa ser um tratamento eficaz para as feridas isquémicas, a sua disponibilidade é limitada.

3.2. Infeções

Quando há um ferimento na pele, os microrganismos que normalmente estão na superfície da pele podem aceder aos tecidos subjacentes. O estado da infeção e de replicação dos microrganismos determina se a ferida será classificada como tendo contaminação, coloniza-

ção, infecção local/colonização crítica, e/ou a propagação da infecção invasiva. A contaminação é a presença de organismos não-replicantes sobre uma ferida, enquanto a colonização é definida como a presença de replicação de microrganismos sobre a ferida sem danos nos tecidos. A infecção local/colonização crítica é um estágio intermediário, com a replicação de microrganismos e o início de respostas nos tecidos locais. A infecção invasiva é definida como a presença de organismos replicantes numa ferida com subsequente lesão no hospedeiro [21]. A inflamação é uma parte normal do processo de cicatrização da ferida, e é importante para a remoção de microrganismos contaminantes. Na ausência de descontaminação eficaz, a inflamação pode ser prolongada uma vez que a remoção microbiana é incompleta. As bactérias e as endotoxinas podem provocar a elevação prolongada de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-1 (IL-1) e o TNF- α , prolongando a fase inflamatória. Se este efeito continuar, a ferida pode entrar num estado crónico que não consegue curar. Esta inflamação prolongada também conduz a um aumento do nível de metaloproteases de matriz (MMPs), uma família de proteases que podem degradar a ECM. Juntamente com o aumento dos níveis de proteases, ocorre uma diminuição do nível dos inibidores naturais da protease. Essa mudança no equilíbrio das proteases pode causar a rápida degradação de fatores de crescimento como acontece em feridas crónicas [21-22]. Em feridas infetadas, à semelhança de outros processos infecciosos, as bactérias surgem sob a forma de biofilmes, que são complexas comunidades de bactérias agregadas e embebidas numa matriz de polissacárido extracelular (EPS) produzido pelas próprias bactérias [21]. Biofilmes maduros desenvolvem microambientes protegidos e são mais resistentes ao tratamento com antibióticos convencionais. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *streptococos* β -hemolíticos são bactérias comuns em feridas infetadas e clinicamente não-infetadas [21,23]. *P. aeruginosa* e *Staphylococcus* parecem desempenhar um papel importante na infecção bacteriana em feridas. Muitas úlceras crónicas provavelmente não cicatrizam devido à presença de biofilmes contendo *P. aeruginosa*, protegendo, assim, as bactérias da atividade fagocitária de neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Este mecanismo pode explicar a falha do antibiótico como tratamento para feridas crónicas [24-25].

3.3. Idade

A população idosa (pessoas com mais de 60 anos de idade) está a aumentar em número mais rápido do que

qualquer outro grupo etário (Organização Mundial de Saúde), e o aumento da idade é um importante fator de risco para a cicatrização deficiente de feridas. Muitos estudos clínicos e em animais, a nível celular e molecular, verificaram mudanças relacionadas com a idade e atrasos na cicatrização de feridas. É geralmente reconhecido que, em adultos saudáveis, o efeito do envelhecimento provoca um atraso na cicatrização da ferida, mas não uma deficiência real em termos de qualidade de cicatrização [4,26]. A cicatrização demorada em idade mais avançada está associada com uma resposta inflamatória alterada, tal como um atraso na infiltração de células T para o local da ferida, com as alterações na produção de quimiocinas e a reduzida capacidade fagocítica do macrófago [10]. Uma demora na re-epitelização, na síntese de colágeno, e na angiogénese, também foi observada em ratos idosos, em comparação com ratos jovens [27]. No geral, existem diferenças globais na cicatrização de feridas entre indivíduos jovens e idosos. Uma revisão das mudanças relacionadas com a idade na capacidade de cura demonstra que todas as fases de cicatrização sofrem alterações características relacionadas com a idade, incluindo o aumento da agregação plaquetária, o aumento da secreção de mediadores inflamatórios, a infiltração atrasada de macrófagos e linfócitos, a infiltração de macrófagos disfuncionais, a diminuição da secreção de fatores de crescimento que retardou a re-epitelização, a angiogénese e a deposição de colágeno [4,28]. Vários tratamentos foram estudados para reduzir a disfunção relacionada com a idade na cicatrização. Curiosamente, foi demonstrado que o exercício melhora a cicatrização de feridas cutâneas em adultos mais velhos, assim como em ratos de mais idade, e a melhoria está associada à diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias na ferida. O resultado de uma melhor cura pode ser devido a uma resposta anti-inflamatória induzida pelo exercício na ferida [26,29].

3.4. Diabetes

A diabetes afeta centenas de milhões de pessoas em todo o mundo. Em Portugal a prevalência da diabetes em 2012 era de 12,9% da população portuguesa (entre os 20 e os 79 anos), correspondendo aproximadamente a 1 milhão de indivíduos [30]. Os indivíduos diabéticos exibem uma deficiência documentada na cicatrização de feridas agudas. Além disso, esta população está propensa a desenvolver úlceras crónicas do pé diabético (DFUs), que são estimadas ocorrer em 15% das pessoas com diabetes. As DFUs são uma complicação grave da diabetes, e precedem 84% das amputações em diabéticos [31]. A cicatrização deficiente em DFUs e em feridas cutâneas

agudas em pessoas com diabetes envolve múltiplos mecanismos fisiopatológicos complexos. Vários estudos têm demonstrado que, no soro de pacientes com diabetes tipo 2, muitas substâncias pró-inflamatórias estão elevadas, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 1 (IL-1), e estes têm sido associados com o desenvolvimento de resistência à insulina [32]. Existe assim uma ligeira inflamação crônica sistêmica, que irá influenciar os tecidos e a sua regeneração. Além disso, na diabetes, os neutrófilos mostram uma redução das atividades quimiotáticas e fagocíticas, tornando as feridas mais propensas à infecção [33,34]. Em feridas diabéticas, também se verifica a disfunção das células T, a diminuição na quimiotaxia, fagocitose e capacidade bactericida dos leucócitos, a disfunção dos fibroblastos e das células epidérmicas. Estes defeitos são responsáveis pela inadequada remoção bacteriana e reparação demorada ou deficiente das feridas em pessoas com diabetes [35,36]. Como resultado, e em contraste com a cicatrização normal de feridas, onde a inflamação ocorre de um modo sequencial e regulada, a inflamação em feridas diabéticas é prolongada levando a uma cicatrização deficiente.

As DFUs são sempre acompanhadas por hipoxia [19]. A situação de hipoxia prolongada, que pode ser derivada da insuficiente irrigação sanguínea e da reduzida angiogênese, é prejudicial para a cicatrização de feridas. A hipoxia pode amplificar a resposta inflamatória precoce, prolongando assim a lesão, aumentando os níveis de radicais livres de oxigênio [37]. A hiperglicemia também pode aumentar o *stress* oxidativo, quando a produção de ROS excede a capacidade antioxidante [38]. A formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), consequente da hiperglicemia, e a interação com seus receptores (RAGE) estão associados a dificuldades de cicatrização em ratos diabéticos [39,40]. Os níveis elevados de metaloproteases são uma característica das úlceras do pé diabético, e os níveis de MMP no fluido de feridas crônicas são quase 60 vezes superiores do que em feridas agudas. Este aumento da atividade das proteases permite a destruição dos tecidos e inibe os processos normais de reparação [37].

Como mencionado acima, a hipoxia contribui para a deficiente cicatrização das DFUs, e as feridas de diabéticos exibem uma angiogênese reduzida. Vários estudos onde investigaram os mecanismos pelos quais ocorre a diminuição da restauração da vasculatura em feridas diabéticas demonstraram que há disfunção na mobilização e a migração das EPCs para as feridas. As terapias com células estaminais destinadas a induzir EPCs ou BM-MSCs têm mostrado resultados promissores em feridas diabé-

ticas, tanto em animais como em estudos clínicos [16,17,41-43]. As células BM-MSCs são capazes de autorrenovação e de se diferenciar em vários tecidos e células, como epitélio de fígado, pulmão, trato gastrointestinal, e em células da pele [44,45]. De fato, foi demonstrado que as BM-MSCs melhoram significativamente a cicatrização de feridas em ratos normais e diabéticos através da diferenciação e liberação de fatores pró-angiogênicos [46]. As EPCs parecem ser as candidatas ideais para a terapia celular *in vivo* em situações isquêmicas. No entanto, tem sido demonstrado que as EPCs de pacientes diabéticos apresentam uma menor proliferação, menor aderência e menor incorporação nas estruturas vasculares. Assim, as EPCs autólogas podem ser de uso limitado [47,48]. A eficácia de terapias com células para aumentar a neovascularização e cura da ferida depende, não só da mobilização de quantidades suficientes de EPCs circulantes, mas também do recrutamento eficiente destas células para o local da ferida. As intervenções terapêuticas, incluem a correção da mobilização e do recrutamento das EPCs para as feridas via administração do fator derivado do estroma (SDF)-1 α , o que origina uma aceleração significativa da cicatrização de feridas diabéticas, ao corrigir a diminuição de EPCs inerente às feridas diabéticas [49]. O desenvolvimento de abordagens eficazes para corrigir os défices de EPCs e deficiências funcionais podem resultar potencialmente no desenvolvimento de terapias eficazes que impeçam a deficiência na cicatrização da ferida, a eliminação de amputações, e a promoção da cicatrização rápida em pacientes com diabetes.

Os níveis do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que desempenha um papel importante no crescimento vascular, diminuem em feridas diabéticas experimentais e clínicas [31,49,50]. Estudos em animais diabéticos têm mostrado que a modulação do dano oxidativo [51] ou a inibição do recetor para produtos finais avançados da glicação [52] melhoram a cicatrização de feridas e foram associadas com um aumento dos níveis de VEGF endógeno. Além disso, a administração de VEGF ou de nanoestruturas que imitam a sua atividade melhoram a cicatrização de feridas isquêmicas [53,54] e o bloqueio de VEGF com anticorpos neutralizantes impede a reparação dos tecidos [55]. Em conjunto, essas evidências reforçam a noção de que o VEGF é fundamental para a reparação nos estados de cura com deficiência e que a adição de VEGF pode ter um potencial uso clínico [52,56]. Na verdade, em estudos com animais, a restauração terapêutica de VEGF demonstrou uma melhoria significativa dos resultados de reparação [57,58].

A neuropatia periférica que ocorre em indivíduos diabéticos também contribui para a cicatrização deficiente

das feridas. O sistema imunológico é normalmente considerado como autorregulado, mas vários estudos sugerem que o sistema nervoso periférico interage estreitamente com o sistema imune e que desempenha funções de regulação neuroimuno importantes [59,60]. Os nervos sensoriais desempenham um papel importante na modulação dos mecanismos de defesa imunitária, uma vez que a pele desnervada exibe uma reduzida infiltração de leucócitos [35,61-63]. Os nervos aferentes podem responder a uma grande variedade de estímulos e, após estimulação, os neuropeptídeos são rapidamente liberados no microambiente [59,60]. Na pele, estes neuropeptídeos atuam através da ativação de recetores presentes numa variedade de células, incluindo células endoteliais microvasculares, queratinócitos, mastócitos, fibroblastos e células do sistema imune. A deficiente inflamação neurogénica, devido à neuropatia diabética, contribui para uma maior susceptibilidade para úlcera do pé diabético. Os neuropeptídeos, tais como o factor de crescimento do nervo (NGF), a neurotensina, a substância P e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina são relevantes para a cicatrização de feridas, uma vez que promovem a quimiotaxia de células, induzem a produção de fatores de crescimento, e estimulam a proliferação de células [64-67]. A utilização de neuropeptídeos como uma abordagem terapêutica para as DFUs pode ser considerada, no entanto, uma das dificuldades é a proteção dos neuropeptídeos das proteases presentes na ferida de maneira que haja uma ação mais prolongada. O nosso grupo desenvolveu biomateriais derivados de quitosano e outros derivados de colagénio para uma entrega mais eficaz destes neuropeptídeos na ferida [66,67], no entanto, novas formulações poderão ser estudadas para o aumento da eficácia da ação dos neuropeptídeos na cicatrização da ferida.

Em resumo, a cura das feridas em indivíduos com diabetes envolvem hipoxia, disfunção de fibroblastos e de células epidérmicas, redução da angiogénese e disfunção neovascular, elevados níveis de metaloproteases, danos das ROS e AGEs, diminuição da resistência ao hospedeiro imune, e neuropatia periférica.

3.5. Obesidade

A prevalência da obesidade continua a aumentar a nível mundial. Em Portugal, os resultados de 2003 a 2005 revelaram que 38,6% da população tinha excesso de peso e 13,8% era obesa, isto é, 52,4% da população apresentava excesso de peso [68]. A obesidade aumenta o risco de muitas doenças e condições de saúde, que incluem a doença cardíaca coronária, diabetes tipo 2, cancro, hi-

pertensão arterial, dislipidemias, acidente vascular cerebral, apneia do sono, problemas respiratórios e cicatrização deficiente de feridas. Indivíduos obesos enfrentam frequentemente complicações na cura da ferida, incluindo a infeção da ferida, deiscência, hematoma e seroma, úlceras de pressão e úlceras venosas [69]. Um aumento da frequência de complicações da ferida foi observado em indivíduos obesos submetidos a cirurgias bariátrica e outras operações [70,71]. Em particular, pacientes obesos apresentam uma maior taxa de infeção de sítio cirúrgico. Muitas destas complicações podem ser resultado de uma menor perfusão relativa e isquemia que ocorre no tecido adiposo subcutâneo. Em feridas cirúrgicas, o aumento da tensão nas bordas da ferida que é frequentemente visto em pacientes obesos também contribui para a deiscência da ferida. A tensão na ferida aumenta a pressão do tecido, reduzindo a microperfusão e a disponibilidade de oxigênio para a ferida [69,70].

O aumento das úlceras de pressão ou ferimentos relacionados com a pressão em indivíduos obesos também é influenciado pela vascularidade reduzida, uma vez que a má perfusão do tecido torna-o mais suscetível a este tipo de lesão. Além disso, a dificuldade ou incapacidade de os indivíduos obesos se reposicionarem aumenta ainda mais o risco de lesões relacionados com a pressão. Também, as dobras cutâneas podem abrigar microrganismos que se desenvolvem em áreas húmidas e contribuem para a infeção e rutura do tecido. O atrito causado pelo contato da pele-a-pele também convida à formação de úlceras. Em conjunto, estes fatores predispõem os indivíduos obesos para o desenvolvimento da cura deficiente de feridas [69,70]. Em adição às condições locais, os fatores sistémicos também desempenham um papel importante na cura deficiente de feridas e complicações em pacientes obesos. A obesidade pode ser ligada ao *stress*, ansiedade, depressão, e todas as situações que podem provocar uma resposta imunitária [69].

A função de tecido adiposo era antes considerada apenas de armazenamento de triglicéridos. Hoje já há uma ideia diferente e muitos estudos têm demonstrado que o tecido adiposo segrega uma grande variedade de substâncias bioactivas que são denominadas por adipocinas. Quer os adipócitos, quer os macrófagos no interior do tecido adiposo, são conhecidos por produzirem moléculas bioativas incluindo citocinas, quimiocinas e fatores hormonais como a leptina, adiponectina e resistina. As adipocinas têm um profundo impacto sobre a resposta imunológica e inflamatória [72-74]. A influência negativa das adipocinas na resposta imunológica sistémica parece influenciar o processo de cura. A disfunção das células mononucleares do sangue periférico, a diminui-

ção da proliferação de linfócitos, e a alteração dos níveis de citocinas periféricas têm sido relatadas na obesidade. É importante referir que muitas das alterações relacionadas com a obesidade e o efeito no sistema imunológico periférico são melhoradas pela perda de peso [75,76].

3.6. Nutrição

A nutrição tem sido reconhecida como um fator muito importante que afeta a cicatrização de feridas. É natural que a deficiência de nutrientes específicos possa ter um profundo impacto sobre a cicatrização de feridas pós-trauma e pós-cirurgia. Os pacientes com feridas crônicas ou que não cicatrizam e com deficiência de nutrição muitas vezes necessitam de nutrientes especiais. Hidratos de carbono, proteínas, gorduras, vitaminas, e minerais, tudo pode afetar o processo de cicatrização.

3.6.1. Hidratos de carbono, proteínas e aminoácidos

Juntamente com as gorduras, os hidratos de carbono são a fonte primária de energia no processo de cicatrização de feridas. A glicose é a fonte principal de combustível usado para criar o ATP celular que fornece energia para a angiogénese e regeneração dos novos tecidos [77]. O uso de glucose como fonte para a síntese de ATP é essencial na prevenção da depleção de outros aminoácidos e substratos proteicos [78,79]. A proteína é um dos fatores mais importantes que afeta a cicatrização de feridas. A deficiência proteica pode prejudicar a formação de capilares, a proliferação de fibroblastos, a síntese de proteoglicanos, a síntese de colagénio e a remodelação da ferida. A deficiência proteica também afeta o sistema imunitário, com consequente diminuição da capacidade fagocitária em leucócitos e um aumento da suscetibilidade à infeção [80,81]. O colagénio é o principal componente proteico do tecido conjuntivo e é principalmente composto de glicina, prolina, e hidroxiprolina. A síntese de colagénio requer hidroxilação da lisina e prolina e co-fatores como o ferro ferroso e a vitamina C. A deficiência em qualquer um desses co-fatores leva à alteração da cicatrização da ferida [82].

A arginina é um aminoácido que é necessário durante os períodos de crescimento máximo, *stress* e lesões. A arginina tem vários efeitos no corpo, incluindo a modulação da função imunológica, a cicatrização de feridas, a secreção hormonal, o tónus vascular e a função endotelial. A arginina é também um precursor da prolina, e, como tal, um determinado nível de arginina é necessário para a deposição de colagénio, angiogénese e contra-

ção da ferida [77,82]. A arginina melhora a função imune e estimula a cicatrização de feridas, em indivíduos saudáveis e doentes [83]. Em situações de *stress* psicológico, aumenta a exigência metabólica de arginina, e a sua suplementação demonstrou ser uma eficaz terapia adjuvante na cicatrização de feridas [82].

A glutamina é o aminoácido mais abundante no plasma e é a principal fonte de energia metabólica de células que proliferam rapidamente, tais como fibroblastos, linfócitos, células epiteliais, e macrófagos [78,82]. A concentração sérica de glutamina é reduzida após uma grande cirurgia, trauma e sepse, e a suplementação deste aminoácido melhora o balanço de nitrogénio e diminui a imunossupressão [82]. A glutamina tem um papel crucial na estimulação da resposta imunitária inflamatória que ocorre no início de cura de feridas [78]. Foi demonstrado que a suplementação oral de glutamina melhora a força de quebra da ferida e aumenta os níveis de colagénio maduro [84].

3.6.2. Ácidos gordos

Os lipídios são usados como suporte nutricional para pacientes cirúrgicos ou gravemente doentes para ajudar a colmatar a demanda de energia e fornecer blocos de construção essenciais para a cicatrização de feridas e reparação de tecido. Os ácidos gordos poli-insaturados (PUFAs), que não podem ser sintetizados de novo por mamíferos, consistem principalmente de duas famílias, n-6 (ómega-6, encontrado no óleo de soja) e n-3 (ácidos ómega-3, encontrado no óleo de peixe). O óleo de peixe tem sido amplamente recomendado como benéfico para a saúde devido aos ácidos gordos ómega-3 como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). Os efeitos dos ácidos gordos ómega-3 na cicatrização de feridas não são conclusivos. Tem sido demonstrado que os ácidos gordos ómega-3 podem influenciar a produção de citocinas pró-inflamatórias, o metabolismo celular, a expressão genética, e a angiogénese em locais de ferida [85,86]. O verdadeiro benefício dos ácidos gordos ómega-3 pode estar na sua capacidade de melhorar a função imunológica sistémica, reduzindo, assim, as complicações infecciosas [78].

3.6.3. Vitaminas, micronutrientes e oligoelementos

As vitaminas C (ácido L-ascórbico), A (retinol), e E (tocoferol) têm efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. A vitamina C tem muitas funções na cicatrização de feridas e uma deficiência nesta vitamina tem vários efeitos sobre a reparação de tecidos. As carências de vitamina C

resultam na cicatrização deficiente de feridas, tendo sido associada a uma diminuição da síntese de colagénio e à proliferação de fibroblastos, diminuição da angiogénese e aumento da fragilidade capilar. Além disso, a deficiência de vitamina C leva a uma reduzida resposta imunitária e ao aumento da susceptibilidade à infeção da ferida [78,82,87]. Da mesma forma, deficiência de vitamina A leva a cicatrização deficiente de feridas. As propriedades biológicas da vitamina A incluem a atividade antioxidante, o aumento da proliferação de fibroblastos, a modulação da diferenciação e proliferação celular, o aumento da síntese de colagénio e a diminuição da degradação da matriz extracelular mediada por MMP [88,89]. A vitamina E, um antioxidante, mantém e estabiliza a integridade da membrana celular proporcionando proteção contra a destruição por oxidação. A vitamina E também tem propriedades anti-inflamatórias e parece ter um papel na diminuição da formação de cicatriz em feridas crónicas. Experiências em animais indicaram que a suplementação de vitamina E é benéfica para a cicatrização de feridas [78,88] e a aplicação tópica de vitamina E tem sido amplamente promovida como um agente anti-cicatrizante. No entanto, os ensaios clínicos não provaram ainda um papel relevante para o tratamento tópico com vitamina E na melhoria dos resultados de cura [90]. Diversos micronutrientes têm sido identificados como sendo importantes para uma boa reparação do tecido. O magnésio funciona como um co-factor para muitas enzimas envolvidas na síntese proteica e de colagénio, enquanto o cobre é um co-factor necessário para a citocromo-oxidase, para a superóxido dismutase citosólica, e para a correta ligação cruzada do colagénio. O zinco é um co-fator para a RNA e DNA polimerase e uma deficiência de zinco provoca um dano significativo na cicatrização de feridas. O ferro é necessário para a hidroxilação de prolina e lisina, e, como resultado, a grave deficiência de ferro pode resultar na diminuição da produção de colagénio [77,78].

Como indicado acima, as necessidades nutricionais da ferida são complexas o que sugere que o apoio nutricional composto beneficiaria tanto a cicatrização aguda como a crónica. Um estudo clínico examinou os efeitos de um suplemento de elevada energia, enriquecido em proteína, contendo arginina, vitamina C, vitamina E e zinco, no tratamento de úlceras de pressão crónicas e demonstrou que este suplemento de alta energia e suplementado melhorou a cura total da úlcera de pressão [91]. Em resumo, as proteínas, os hidratos de carbono, a arginina, a glutamina, os ácidos gordos poli-insaturados, a vitamina A, a vitamina C, a vitamina E, o magnésio, o cobre, o zinco, e o ferro desempenham um papel im-

portante na cicatrização de feridas e as suas deficiências afetam a cicatrização da ferida.

> 4. CONCLUSÕES

A cicatrização de feridas é um complexo processo biológico que consiste nas fases de hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. Este processo envolve um grande número de tipos de células, incluindo neutrófilos, macrófagos, linfócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais. São vários os fatores que podem causar uma cicatrização deficiente da ferida. Um ou mais fatores podem influenciar uma ou mais fases de cura da ferida, contribuindo para o resultado global do processo de cura. Um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na influência dos diversos fatores na cura da ferida pode permitir o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de feridas com dificuldade em cicatrizar. <

Agradecimentos

Esta publicação foi apoiada pelas instituições: Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT), PTDC/SAU-FAR/121109/2010 (ECL), SFRH/BPD/46341/2008 (ECL); Sociedade Portuguesa de Diabetologia (ECL); Associação Europeia para o estudo da Diabetes (EASD), EFSD/JDRF/Novo Nordisk European Programme in Type 1 Diabetes Research (ECL).

BIBLIOGRAFIA

1. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*. 2005; 366(9498): 1736-43.
2. Falanga V. Wound healing. An overview. *J Dermatol Surg Oncol*. 1993; 19(8): 689-90.
3. Falanga V. Wound healing and chronic wounds. *J Cutan Med Surg*. 1998; 3 (Suppl 1): S1-5.
4. Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World J Surg*. 2004; 28(3): 321-6.
5. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117 (7 Suppl): 12S-34S.
6. Meszaros AJ, Reichner JS, Albina JE. Macrophage-induced neutrophil apoptosis. *J Immunol*. 2000; 165(1): 435-41.
7. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(12): 958-69.
8. Ploeger DT, Hoesper NA, Schipper M, Koerts JA, de Rond S, Bank RA. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/M2 polarized macrophages influence the phenotypical

- state of dermal fibroblasts. *Cell Commun Signal*. 2013; 11(1): 29.
9. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg*. 2004; 187(5A): 11S-6S.
 10. Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol*. 2001; 117(5): 1027-35.
 11. Gawronska-Kozak B, Bogacki M, Rim JS, Monroe WT, Manuel JA. Scarless skin repair in immunodeficient mice. *Wound Repair Regen*. 2006; 14(3): 265-76.
 12. Jameson J, Havran WL. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev*. 2007; 215: 114-22.
 13. Mills RE, Taylor KR, Podshivalova K, McKay DB, Jameson JM. Defects in skin gamma delta T cell function contribute to delayed wound repair in rapamycin-treated mice. *J Immunol*. 2008; 181(6): 3974-83.
 14. Cha J, Falanga V. Stem cells in cutaneous wound healing. *Clin Dermatol*. 2007; 25(1): 73-8.
 15. Rea S, Giles NL, Webb S, Adcroft KF, Evill LM, Strickland DH, et al. Bone marrow-derived cells in the healing burn wound – more than just inflammation. *Burns*. 2009; 35(3): 356-64.
 16. Liu ZJ, Velazquez OC. Hyperoxia, endothelial progenitor cell mobilization, and diabetic wound healing. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10(11): 1869-82.
 17. Wu Y, Wang J, Scott PG, Tredget EE. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen*. 2007; 15 (Suppl 1): S18-26.
 18. Rodriguez PG, Felix FN, Woodley DT, Shim EK. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatol Surg*. 2008; 34(9): 1159-69.
 19. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing – more than a nutrient. *World J Surg*. 2004; 28(3): 294-300.
 20. Yang C, Weng H, Chen L, Yang H, Luo G, Mai L, et al. Transcutaneous oxygen pressure measurement in diabetic foot ulcers: mean values and cut-point for wound healing. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2013; 40(6): 585-9.
 21. Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis*. 2004; 17(2): 91-6.
 22. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clin Dermatol*. 2007; 25(1): 19-25.
 23. Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E, Eaglstein WH, Mertz PM. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen*. 2008; 16(1): 23-9.
 24. Bjarnsholt T, Kirketerp-Moller K, Jensen PO, Madsen KG, Phipps R, Krogfelt K, et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen*. 2008; 16(1): 2-10.
 25. Watters C, DeLeon K, Trivedi U, Griswold JA, Lyte M, Hampel KJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms perturb wound resolution and antibiotic tolerance in diabetic mice. *Med Microbiol Immunol*. 2013; 202(2): 131-41.
 26. Keylock KT, Vieira VJ, Wallig MA, DiPietro LA, Schrementi M, Woods JA. Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 294(1): R179-84.
 27. Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest*. 1999; 79(12): 1479-87.
 28. Soybir OC, Gurdal SO, Oran ES, Tulubas F, Yuksel M, Akyildiz AI, et al. Delayed cutaneous wound healing in aged rats compared to younger ones. *Int Wound J*. 2012; 9(5): 478-87.
 29. Emery CF, Kiecolt-Glaser JK, Glaser R, Malarkey WB, Frid DJ. Exercise accelerates wound healing among healthy older adults: a preliminary investigation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005; 60(11): 1432-6.
 30. Gardete CL, Boavida JM, Fragoso de Almeida JP, Cardoso SM, Dores J, Duarte JS, et al. Diabetes: Factos e Números 2013. Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes. 2013.
 31. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest*. 2007; 117(5): 1219-22.
 32. Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med*. 2008; 14(3-4): 222-31.
 33. Alba-Loureiro TC, Hirabara SM, Mendonca JR, Curi R, Pithon-Curi TC. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. *J Endocrinol*. 2006; 188(2): 295-303.
 34. Marhoffer W, Stein M, Schleinkofer L, Federlin K. Evidence of ex vivo and in vitro impaired neutrophil oxidative burst and phagocytic capacity in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 1993; 19(3): 183-8.
 35. Gary Sibbald R, Woo KY. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008; 24 (Suppl 1): S25-30.
 36. Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J, Mekkes JR, Bos JD, Middekoop E. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol*. 1998; 111(5): 850-7.
 37. Woo K, Ayello EA, Sibbald RG. The edge effect: current therapeutic options to advance the wound edge. *Adv Skin Wound Care*. 2007; 20(2): 99-117; quiz 8-9.
 38. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev*. 2004; 25(4): 612-28.
 39. Huijberts MS, Schaper NC, Schalkwijk CG. Advanced glycation end products and diabetic foot disease. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008; 24 (Suppl 1): S19-24.
 40. Majtan J. Methylglyoxal-a potential risk factor of manuka honey in healing of diabetic ulcers. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011; 2011: 295494.
 41. Balaji S, King A, Crombleholme TM, Keswani SG. The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound

- Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2(6): 283-95.
42. Pedroso DC, Tellechea A, Moura L, Fidalgo-Carvalho I, Duarte J, Carvalho E, et al. Improved survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells co-cultured with endothelial cells. *PLoS One*. 2011; 6(1): e16114.
 43. Tecilazich F, Dinh T, Pradhan-Nabzdyk L, Leal E, Tellechea A, Kafanas A, et al. Role of endothelial progenitor cells and inflammatory cytokines in healing of diabetic foot ulcers. *PLoS One*. 2013; 8(12): e83314.
 44. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001; 105(3): 369-77.
 45. Nakagawa H, Akita S, Fukui M, Fujii T, Akino K. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br J Dermatol*. 2005; 153(1): 29-36.
 46. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 2007; 25(10): 2648-59.
 47. Capla JM, Grogan RH, Callaghan MJ, Galiano RD, Tepper OM, Ceradini DJ, et al. Diabetes impairs endothelial progenitor cell-mediated blood vessel formation in response to hypoxia. *Plast Reconstr Surg*. 2007; 119(1): 59-70.
 48. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 2002; 106(22): 2781-6.
 49. Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, Chen H, Goldstein LJ, Buerk DG, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest*. 2007; 117(5): 1249-59.
 50. Quattrini C, Jeziorska M, Boulton AJ, Malik RA. Reduced vascular endothelial growth factor expression and intra-epidermal nerve fiber loss in human diabetic neuropathy. *Diabetes Care*. 2008; 31(1): 140-5.
 51. Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D, Galeano M, Deodato B, Colonna M, et al. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. *Diabetes*. 2001; 50(3): 667-74.
 52. Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Buccionelli LG, 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.
 53. Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, Farrell CL, Lyons D, Mustoe TA. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Arch Surg*. 1999; 134(2): 200-5.
 54. Webber MJ, Tongers J, Newcomb CJ, Marquardt KT, Bauersachs J, Losordo DW, et al. Supramolecular nanostructures that mimic VEGF as a strategy for ischemic tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(33): 13438-43.
 55. Howdieshell TR, Callaway D, Webb WL, Gaines MD, Procter CD, Jr., Sathyanarayana, et al. Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. *J Surg Res*. 2001; 96(2): 173-82.
 56. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*. 1995; 270(21): 12607-13.
 57. Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol*. 2004; 164(6): 1935-47.
 58. Kirchner LM, Meerbaum SO, Gruber BS, Knoll AK, Bulgrin J, Taylor RA, et al. Effects of vascular endothelial growth factor on wound closure rates in the genetically diabetic mouse model. *Wound Repair Regen*. 2003; 11(2): 127-31.
 59. Shepherd AJ, Downing JE, Miyan JA. Without nerves, immunology remains incomplete -in vivo veritas. *Immunology*. 2005; 116(2): 145-63.
 60. Steinhoff M, Stander S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol*. 2003; 139(11): 1479-88.
 61. Galkowska H, Olszewski WL, Wojewodzka U, Rosinski G, Karnafel W. Neurogenic factors in the impaired healing of diabetic foot ulcers. *J Surg Res*. 2006; 134(2): 252-8.
 62. Pradhan Nabzdyk L, Kuchibhotla S, Guthrie P, Chun M, Auster ME, Nabzdyk C, et al. Expression of neuropeptides and cytokines in a rabbit model of diabetic neuroischemic wound healing. *J Vasc Surg*. 2013; 58(3): 766-75 e12.
 63. Pradhan L, Cai X, Wu S, Andersen ND, Martin M, Malek J, et al. Gene expression of pro-inflammatory cytokines and neuropeptides in diabetic wound healing. *J Surg Res*. 2011; 167(2): 336-42.
 64. da Silva L, Carvalho E, Cruz MT. Role of neuropeptides in skin inflammation and its involvement in diabetic wound healing. *Expert Opin Biol Ther*. 2010; 10(10): 1427-39.
 65. Moura LI, Cruz MT, Carvalho E. The effect of neurotensin in human keratinocytes – implication on impaired wound healing in diabetes. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2014; 239(1): 6-12.
 66. Moura LI, Dias AM, Leal EC, Carvalho L, de Sousa HC, Carvalho E. Chitosan-based dressings loaded with neurotensin – an efficient strategy to improve early diabetic wound healing. *Acta Biomater*. 2014; 10(2): 843-57.
 67. Moura LI, Dias AM, Suesca E, Casadiegos S, Leal EC, Fontanilla MR, et al. Neurotensin-loaded collagen dressings reduce inflammation and improve wound healing in diabetic mice. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842(1): 32-43.

68. do Carmo I, dos Santos O, Camolas J, Vieira J, Carreira M, Medina L, et al. Prevalência da Obesidade em Portugal. *Endocrinologia, Diabetes & Obesidade*. 2007; 1(1): 11-6.
69. Wilson JA, Clark JJ. Obesity: impediment to postsurgical wound healing. *Adv Skin Wound Care*. 2004; 17(8): 426-35.
70. Anaya DA, Dellinger EP. The obese surgical patient: a susceptible host for infection. *Surg Infect (Larchmt)*. 2006; 7(5): 473-80.
71. Greco JA, 3rd, Castaldo ET, Nanney LB, Wendel JJ, Summitt JB, Kelly KJ, et al. The effect of weight loss surgery and body mass index on wound complications after abdominal contouring operations. *Ann Plast Surg*. 2008; 61(3): 235-42.
72. Calabro P, Yeh ET. Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Subcell Biochem*. 2007; 42: 63-91.
73. Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005; 19(4): 547-66.
74. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci*. 2009; 54(9): 1847-56.
75. Fontana L, Eagon JC, Colonna M, Klein S. Impaired mononuclear cell immune function in extreme obesity is corrected by weight loss. *Rejuvenation Res*. 2007; 10(1): 41-6.
76. Nieman DC, Henson DA, Nehlsen-Cannarella SL, Ekkens M, Utter AC, Butterworth DE, et al. Influence of obesity on immune function. *J Am Diet Assoc*. 1999; 99(3): 294-9.
77. Shepherd AA. Nutrition for optimum wound healing. *Nurs Stand*. 2003; 18(6): 55-8.
78. Arnold M, Barbul A. Nutrition and wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117 (7 Suppl): 425-58S.
79. Nabuurs CI, Choe CU, Veltien A, Kan HE, van Loon LJ, Rodenburg RJ, et al. Disturbed energy metabolism and muscular dystrophy caused by pure creatine deficiency are reversible by creatine intake. *J Physiol*. 2013; 591 (Pt 2): 571-92.
80. Badr G. Supplementation with undenatured whey protein during diabetes mellitus improves the healing and closure of diabetic wounds through the rescue of functional long-lived wound macrophages. *Cell Physiol Biochem*. 2012; 29(3-4): 571-82.
81. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Clin Plast Surg*. 2012; 39(1): 85-97.
82. Campos AC, Groth AK, Branco AB. Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008; 11(3): 281-8.
83. Tong BC, Barbul A. Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Rev Med Chem*. 2004; 4(8): 823-32.
84. da Costa MA, Campos AC, Coelho JC, de Barros AM, Matsu-moto HM. Oral glutamine and the healing of colonic anastomoses in rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2003; 27(3): 182-5; discussion 5-6.
85. McDaniel JC, Belury M, Ahijevych K, Blakely W. Omega-3 fatty acids effect on wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008; 16(3): 337-45.
86. Shingel KI, Faure MP, Azoulay L, Roberge C, Deckelbaum RJ. Solid emulsion gel as a vehicle for delivery of polyunsaturated fatty acids: implications for tissue repair, dermal angiogenesis and wound healing. *J Tissue Eng Regen Med*. 2008; 2(7): 383-93.
87. Moores J. Vitamin C: a wound healing perspective. *Br J Community Nurs*. 2013 Dec; Suppl: S6, S8-11.
88. Burgess C. Topical vitamins. *J Drugs Dermatol*. 2008; 7 (7 Suppl): s2-6.
89. Ellinger S, Stehle P. Efficacy of vitamin supplementation in situations with wound healing disorders: results from clinical intervention studies. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009; 12(6): 588-95.
90. Khoosal D, Goldman RD. Vitamin E for treating children's scars. Does it help reduce scarring? *Can Fam Physician*. 2006; 52: 855-6.
91. Heyman H, Van De Looerbosch DE, Meijer EP, Schols JM. Benefits of an oral nutritional supplement on pressure ulcer healing in long-term care residents. *J Wound Care*. 2008; 17(11): 476-8, 80.