



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas/FCA

JÉSSICA RONDONI SILVA

**ÁCIDO GRAXO LINOLEICO E CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: ENFOQUE NA
ANGIOGÊNESE**

LINOLEIC FATTY ACID AND WOUND HEALING: FOCUS ON ANGIOGENESIS

Limeira
2019

JÉSSICA RONDONI SILVA

**ÁCIDO GRAXO LINOLEICO E CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: ENFOQUE NA
ANGIOGÊNESE**

LINOLEIC FATTY ACID AND WOUND HEALING: FOCUS ON ANGIOGENESIS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, na Área de Ciências Nutricionais e Metabolismo.

Dissertation presented to the faculty of Applied Science of University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of master in Nutritional Science and Sports and Metabolism, in the area of Nutritional Science and Metabolism.

Orientadora: PROF^a. DRA. HOSANA GOMES RODRIGUES

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DISSERTAÇÃO/TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA JESSICA
RONDONI SILVA, E ORIENTADA PELA
PROF^a. DRA. HOSANA GOMES
RODRIGUES

Limeira
2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2016/15955-4

Ficha catalográfica

Universidade Estadual de Campinas

Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas

Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

Si38a	Silva, Jéssica Rondoni, 1993- Ácido graxo linoleico e cicatrização de feridas : enfoque na angiogênese / Jéssica Rondoni Silva. – Limeira, SP : [s.n.], 2019. Orientador: Hosana Gomes Rodrigues. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas. 1. Cicatrização de feridas. 2. Vasos sanguíneos. 3. Ácido linoleico. I. Rodrigues, Hosana Gomes, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Linoleic fatty acid and wound healing : focus on angiogenesis

Palavras-chave em inglês:

Wound healing

Blood vessels

Linoleic acid

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Hosana Gomes Rodrigues [Orientador]

Rodrigues, Hosana Gomes

Igor Luchini Baptista

Baptista, Igor Luchini

Marcelo Bispo de Jesus

Data de defesa: 01-02-2019

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Data da defesa: 01/02/2019

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, na Área de Ciências Nutricionais e Metabolismo

Comissão examinadora:

Profa. Dra. Hosana Gomes Rodrigues – Presidente

Prof. Dr. Igor Luchini Baptista

Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca, encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna Jéssica Rondoni Silva.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmã, Ronaldo, Elaine e Juliana, por acreditarem em mim e se alegrarem com cada conquista. Por todo o conforto oriundo de palavras de encorajamento diário. Sem vocês eu nada seria.

Ao Renan, meu noivo, por representar o verdadeiro sentido da palavra amor e por me lembrar em todos os momentos que temos um ao outro, e muito a ser conquistado.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por se fazer presente em cada detalhe do meu dia-dia.

Aos meus pais e irmã, que sempre acreditaram na minha capacidade, e me incentivaram na busca desse sonho, hoje concretizado. Serei eternamente grata por toda a confiança em mim depositada e por acreditarem que a decisão tomada dois anos atrás me renderia a maior conquista pessoal e profissional. Não poderia ter tido um apoio melhor!.

Ao Renan, por acreditar que substituir uma carreira “certa” por um mergulho em águas desconhecidas, valeria a pena. Por me encorajar e me incentivar em cada obstáculo ultrapassado, por entender meus momentos de ansiedade e angustia, e ser a minha paz e meu conforto. Sem você nada faria sentido!

À Professora Doutora Hosana Gomes Rodrigues, por me acolher em seu laboratório e por acreditar em mim, e exercer com maestria todo o direcionamento da minha pesquisa. Devo muito a você pelo imenso progresso pessoal e profissional que obtive neste tempo de trabalho em conjunto.

Às minhas duas “casas”, LabNUTRE e LabImunoinflamação, que me renderam amizades que serão eternas. Pessoas queridas que me acolheram e me ensinaram com o convívio diário que um sorriso e um abraço ameniza todo o peso da nossa rotina. Todo o conhecimento que aprendi com vocês me transformou, e será levado para sempre junto comigo.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2016/15955-4), pelo apoio financeiro para que meu projeto pudesse ser desenvolvido com qualidade.

Este estudo também foi financiado pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil(CAPES) - Código Financeiro 001

Agradecemos também o apoio de Pró-Reitoria de Pesquisa da UNICAMP através do auxílio FAEPEX

*“Me lembro do dia em que rezei pelas coisas que tenho hoje”
(D.A)*

RESUMO

A cicatrização de feridas é um processo fisiológico iniciado sempre que há o rompimento de qualquer tecido corporal. Ela é dividida em 3 fases concomitantes, sendo elas: inflamação, proliferação e maturação. Durante a fase proliferativa, a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) desempenha um papel fundamental, uma vez que os vasos são essenciais para a chegada de células inflamatórias, remoção dos debrís celulares e fornecimento adequado de oxigênio e nutrientes, ao local lesionado. Em estudos anteriores observamos que o ácido graxo linoleico (LA, 18:2 ω -6), induziu o aumento no número de novos vasos sanguíneos na pele, favorecendo a cicatrização, em ratos. Entretanto, os mecanismos envolvidos nesses efeitos não foram esclarecidos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel do linoleico na angiogênese, e seu envolvimento com a via de sinalização do VEGF/HIF. Para tanto, induzimos feridas em camundongos C57BL/6 e avaliamos o perfil histológico desse tecido, bem como a produção de VEGF, TNF- α e IL-6. A angiogênese foi avaliada *in vitro*, em células endoteliais, obtidas a partir do explante pulmonar de camundongos C57BL/6. Nestas células, investigamos os efeitos de LA sobre importantes eventos, como produção de VEGF (método de ELISA), migração (*Scratch assay*), proliferação (*Click It® assay*) e modulação da expressão gênica (qRT-PCR). Também foram utilizadas células endoteliais primárias obtidas de camundongos HIF-1 α *reporter* para observar o papel do LA na possível ativação de HIF-1 α (*Kit Dual Luciferase Reporter Assay System* – Promega). Em animais C57BL/6 a suplementação com LA aumentou a presença de vasos e reduziu o edema, bem como o infiltrado inflamatório nas amostras de 7 dias em relação ao grupo controle. Observamos também elevação nas concentrações de TNF- α (3 e 10 dias), IL-6 (7 dias) e VEGF (10 dias). *In vitro*, o tratamento com LA, por 24 horas, aumentou a taxa de proliferação celular e não alterou a migração das células. LA elevou, também, as concentrações de VEGF (16%) e a expressão gênica de *Vegf* (57%), *Hif-1 α* (60%), *Glut-1* (17%), *Tgf- β* (17%), *Pfkb-3* (19%). Em células endoteliais de camundongos HIF *reporter* foi observado aumento na atividade HIF-1 α (38%) após 4 horas de tratamento com LA. Deste modo o LA demonstrou aumentar a angiogênese *in vivo*. Este efeito parece estar envolvido com a via de sinalização de VEGF/HIF.

Palavras-Chave: Cicatrização, angiogênese e linoleico.

ABSTRACT

Wound healing is a physiological process initiated whenever there is a breakdown of any body tissue. It is divided into 3 concomitant phases: inflammation, proliferation and maturation. During the proliferative phase, formation of new blood vessels (angiogenesis) plays a key role, as vessels are essential for the arrival of inflammatory cells, removal of cellular debris and adequate supply of oxygen and nutrients to the injured site. In previous studies, we observed that linoleic acid (LA, 18: 2 ω -6) increased the number of new blood vessels in the skin, favoring healing in rats. However, the mechanisms involved in these effects have not been clarified. Thus, the objective of the present study was to evaluate the role of linoleic in angiogenesis and its involvement with the VEGF/HIF signaling pathway. For this, we induced wounds in C57BL/6 mice and evaluated the histological profile of this tissue, as well as the production of VEGF, TNF- α and IL-6. Angiogenesis was evaluated *in vitro* on endothelial cells obtained from the lung explant of C57BL/6 mice. In these cells, we investigated the effects of LA on important events such as VEGF (ELISA), migration (Scratch assay), proliferation (Click It® assay) and gene expression modulation (qRT-PCR). Primary endothelial cells obtained from HIF-1 α *reporter* mice were also used to observe the role of LA in the possible activation of HIF-1 α (Dual Luciferase Reporter Assay System Kit - Promega). In C57BL/6 animals, LA supplementation increased the presence of vessels and reduced edema as well as inflammatory infiltrate in the 7-day samples, in relation to the control group. We also observed elevations in concentrations of TNF- α (3 and 10 days), IL-6 (7 days) and VEGF (10 days). *In vitro*, LA treatment, for 24 hours, increased the rate of cell proliferation and did not alter cell migration. LA increased the concentrations of VEGF (16%) and the gene expression of Vegf (57%), Hif-1 α (60%), Glut-1 (17%), Tgf- 3 (19%). In endothelial cells isolated from HIF *reporter* mice, an increase in HIF-1 α activity (38%) was observed after 4 hours of LA treatment. Thus LA has been shown to increase angiogenesis *in vivo*. This effect appears to be involved with the VEGF/HIF signaling pathway.

Key words: Wound healing, angiogenesis and linoleic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de cicatrização de feridas.....	14
Figura 2. Mecanismos de degradação e estabilização de HIF1 α	16
Figura 3. Processo da angiogênese.....	17
Figura 4. Via de sinalização do VEGF.....	17
Figura 5. Desenho experimental	20
Figura 6. Esquema de obtenção de células endoteliais	22
Figura 7. Esquema da reação de calceína- AM.....	23
Figura 8. Corte histológico da região de transição entre borda e ferida.....	28
Figura 9. Perfil de citocinas em tecido cicatricial de camundongos suplementados.....	29
Figura 10. Caracterização celular por citometria de fluxo.....	30
Figura 11. Análise da toxicidade de LA.....	31
Figura 12. Análise da migração celular	32
Figura 13. Análise da proliferação celular.....	33
Figura 14. Concentrações do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).....	34
Figura 15. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	34
Figura 16. Estabilidade de HIF1 α em células endoteliais	35
Figura 17. Expressão relativa de genes-alvo de HIF1 α	36

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Sequências de primers26

LISTA DE ABREVIATURAS

ANGPTL4: Angiopietina tipo 4

DLL4: Delta tipo 4

DMEM: Meio Dulbecco MEM

EdU: 5-etinil-2-deoxiuridina

eNOS: Enzima óxido nítrico sintase endotelial

EROs: Espécies reativas de oxigênio

HIF- α : Fator induzido por hipóxia alfa

LA: Ácido linoleico

MTT: 4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio

PBS: Tampão fosfato-salino

PECAM: Molécula de adesão celular endotelial plaquetária

PS: Penicilina e estreptomicina

SBF: Soro bovino fetal

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-2: Receptor do fator de crescimento endotelial vascular

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 -Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

TIMP - Inibidor de metaloproteinases tecidual

TGF β - Fator de crescimento transformante beta

MMP9 – Metalaproteinase de matriz 9

B2m- Beta 2 microglobulina

iNos – Óxido nítrico-sintase induzida

Pfkfb-3 - 6 fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-bifosfatase isoforma 3

Glut-1 – Transportador de glicose 1

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. HIPÓTESE	19
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivos gerais.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Comitê de ética	20
4.2 Modelo de indução de feridas e suplementação	20
4.3 Administração oral do ácido graxo linoleico.....	20
4.4 Análises histológicas	20
4.5 Homogeneização do tecido cicatricial.....	21
4.6 Produção de fator de crescimento e citocinas	21
4.7 Isolamento de células endoteliais.....	21
4.8 Caracterização da população celular por citometria de fluxo.....	22
4.9 Ensaio de toxicidade por MTT.....	22
4.10 Ensaio de viabilidade por Calceina AM	23
4.11 Ensaio de migração celular por “Scratch”.....	24
4.12 Ensaio de proliferação celular por “Click it”	24
4.13 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	25
4.14 Cultura de células endoteliais de animais HIF-1 α luciferase	25
4.15 Análise da expressão gênica por qRT-PCR	26
4.16 Análise estatística	27
5. RESULTADO	
5.1 Imagens representativas coradas com HE.....	28
5.2 Perfil de citocinas em tecido cicatricial de camundongos.....	29
5.3 Caracterização da população celular por citometria de fluxo.....	29
5.4 Altas concentrações de linoleico são tóxicas às células endoteliais.....	30
5.5 Tratamento com LA não altera migração celular.....	32
5.6 Tratamento com LA aumenta a proliferação celular	33
5.7 LA aumenta produção de VEGF	34
5.8 LA reduz a produção de espécies reativas de oxigênio.....	34
5.9 LA aumenta a produção de HIF-1 α estável em camundongos <i>reporter</i>	35
5.10 LA aumenta expressão gênica de genes alvo de HIF-1 α	35
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO.....	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

Cicatrização de feridas cutâneas é um processo fisiológico essencial e evolutivamente conservado que envolve diversas células, como neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, bem como mediadores inflamatórios, como interleucinas (IL-1 β) ou o fator de necrose tumoral (TNF- α) entre outros (Shaw & Martin, 2009). Este processo é didaticamente dividido em 3 fases concomitantes: inflamatória, proliferativa e remodelamento (**Figura 1**).

A fase inflamatória é caracterizada pelo aumento do influxo de leucócitos (principalmente mms consequente secreção de mediadores químicos como aminas vasoativas (histamina), que irão aumentar a permeabilidade capilar e, assim, favorecer o processo migratório. Primeiramente, chegarão neutrófilos atraídos por produtos bacterianos como o lipopolissacarídeo (LPS); depois migrarão monócitos que se tornarão macrófagos, os quais são responsáveis pela fagocitose de debris celulares, microrganismos e neutrófilos em apoptose. Associado à fagocitose, os macrófagos liberam enzimas lisossomais como mieloperoxidases e elastases, e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio impulsionando, assim, a destruição dos materiais fagocitados (Eming et al., 2007). Além disso, os macrófagos aumentam a produção de citocinas como TNF- α , IL-1 β e interleucina-6 (IL-6) ampliando a resposta inflamatória. Entre o terceiro e o quinto dia após a lesão, os macrófagos mudam o seu perfil inflamatório, visto até então, e passam a produzir fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) o fator de crescimento vascular-endotelial (VEGF) e a interleucina-10 (IL-10). Este período caracteriza a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa, uma vez que essas substâncias liberadas agem aumentando a migração, proliferação e diferenciação de fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais (Janis & Harrison, 2016).

A fase de proliferação tem como objetivo diminuir a área lesionada através da contração das bordas da ferida, fibroplasia (formação de tecido fibroso) e reepitelização. Esse processo pode durar até o 14º dia, com envolvimento de processos como o da angiogênese (formação de novos vasos), produção de tecido de granulação, deposição de colágeno, e re-epitelização (Rosen, 2002). Condições hipóxicas no local da lesão levam a síntese de óxido nítrico (NO) por células endoteliais que podem estimular a produção de VEGF, promovendo a angiogênese (Broughton, Janis, Attinger; 2006).

A última fase, é conhecida como a fase de remodelamento, que se inicia de duas a três semanas após a lesão. O objetivo dessa fase é atingir a reorganização completa do tecido através da reticulação do colágeno, remodelamento e contração da ferida (Janis & Harrison, 2016).

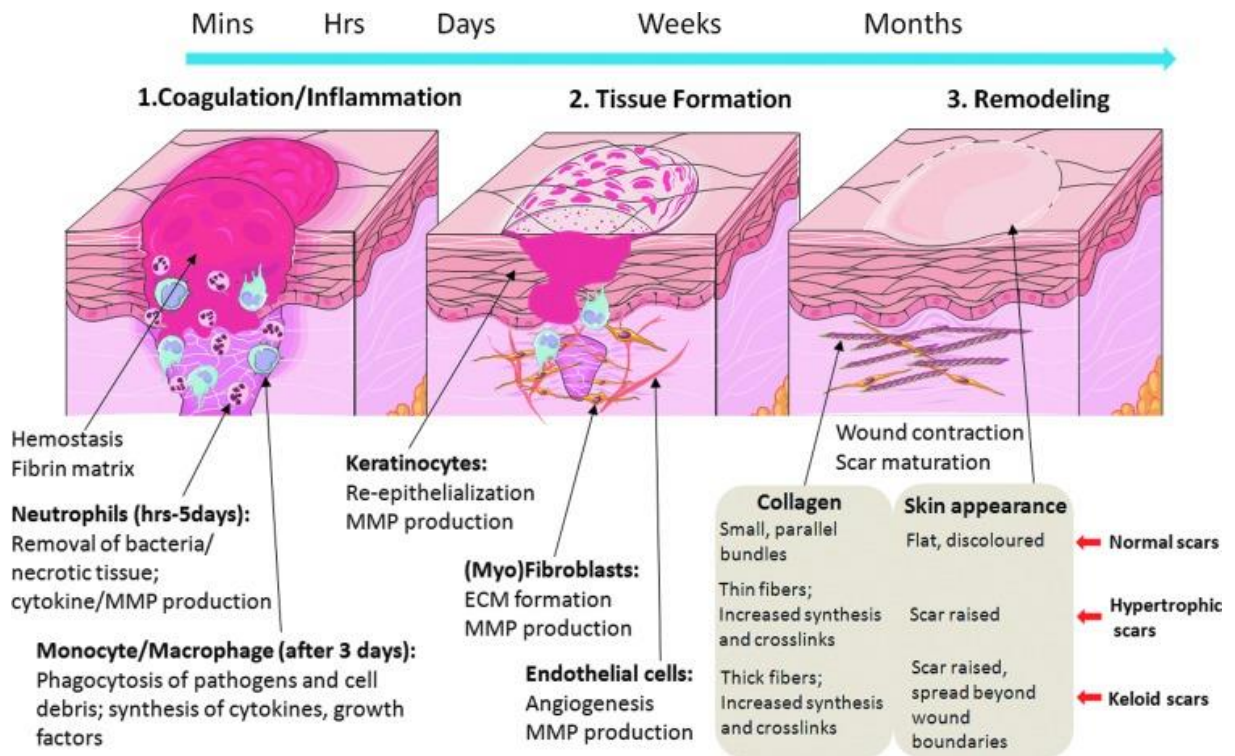


Figura 1. Processo de cicatrização de feridas. Didaticamente dividido em três fases, concomitantes e que se sobrepõem: Fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelamento. *Adaptado de: XUE; JACKSON, (2015).*

A completa resolução de uma ferida só é possível com a formação de novos vasos. Este processo é conhecido como angiogênese. A angiogênese tornará possível o fornecimento adequado de oxigênio, nutrientes e células, que irão reconstruir o tecido (Frykberg & Banks, 2015; Cash & Martin, 2016).

O termo angiogênese foi utilizado pela primeira vez em 1935, quando foi descrita a formação de novos vasos sanguíneos na placenta de macacas prenhas (Hertig, 1935). Desde então, a angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes. Ela está envolvida em processos fisiológicos e patológicos como cicatrização de feridas e câncer, respectivamente.

Antigamente o endotélio era considerado uma monocamada com vasos sanguíneos com uma mera função de barreira. Porém, hoje, sabe-se que este órgão bem como as células

endoteliais, desempenham funções essenciais como transporte de oxigênio e nutrientes, controle vasomotor, migração leucocitária e adesão plaquetária, secreção de fatores angiogênicos, estimulação de células musculares lisas e fibroblastos, e formação de novos vasos (Aird, 2004).

Recentemente, tem sido discutido as vias metabólicas utilizadas pelas células endoteliais, e ativação ou não dessas vias podem ser relacionadas com várias doenças decorrente de má adaptações metabólicas de células endoteliais, como por exemplo aterosclerose, diabetes, câncer e má cicatrização. Em algumas condições como isquemia e inflamação as células endoteliais podem rapidamente mudar seu estado antes quiescente, para um estado angiogênico com o início da formação de novos vasos (De Bock et al., 2013).

A angiogênese é um processo altamente complexo, dinâmico, e regulado em cada estágio por várias moléculas pró-angiogênicas como o fator de crescimento vascular-endotelial (VEGF) e a metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9) e anti-angiogênicas como o fator de crescimento transformante- β (TGF- β) e a angiotatina (Betz et al., 2016; Carmeliet, 2000).

Durante a angiogênese fisiológica, como ocorre na cicatrização, uma parte das células endoteliais se diferencia em *tip cells* e o restante das células adquire um perfil mais proliferativo (*stalk cells*). As *tip cells* são células endoteliais mais móveis, invasivas que emitem filamentos respondendo rapidamente a fatores de crescimento, agentes quimioatraentes ou repulsivos. As *stalk cells*, por sua vez, já apresentam um fenótipo mais proliferativo e contribuem para a manutenção da estrutura e função dos novos vasos (Villard et al., 2018).

A falta de oxigênio em um tecido é um dos fatores indutores de angiogênese, uma vez que a oxigenação local precisa ser reestabelecida. Assim, o efeito angiogênico da hipóxia é mediado pela ativação do fator induzido por hipóxia (HIF) o qual induz a expressão de genes pró-angiogênicos como o VEGF, angiopoietina –tipo 4 (ANGPTL4) e da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Patel et al., 2010).

O HIF-1 é um fator de transcrição heterodimérico, sendo composto por uma subunidade alfa (HIF-1 α) e uma subunidade beta (HIF-1 β). A expressão de HIF-1 α é regulada pela quantidade de oxigênio, havendo rápida degradação dessa proteína na presença de concentrações normais de oxigênio, enquanto que a HIF-1 β é expressa constitutivamente (Semenza, 2011).

Em condições normais de oxigênio a subunidade alfa de HIF-1 é degradada pela enzima prolil-hidroxilase (PHD). Essa enzima hidroxila os domínios de degradação da subunidade alfa (**Figura 2**), a qual é, posteriormente, ubiquitinada pela ubiquitina ligase (fator de von Hippel

Lindal ou vHL) e segue para degradação no proteossoma. Já em condições de baixa disponibilidade de oxigênio (hipóxia), a PHD é inibida e com isso a subunidade alfa se acumula no citoplasma de onde transloca ao núcleo e dá origem ao heterodímero que por sua vez atua como fator de transcrição modulando a expressão de vários genes cujas proteínas estão associadas a mecanismos patológicos, fisiológicos e homeostáticos (Schofield & Ratcliffe, 2004).

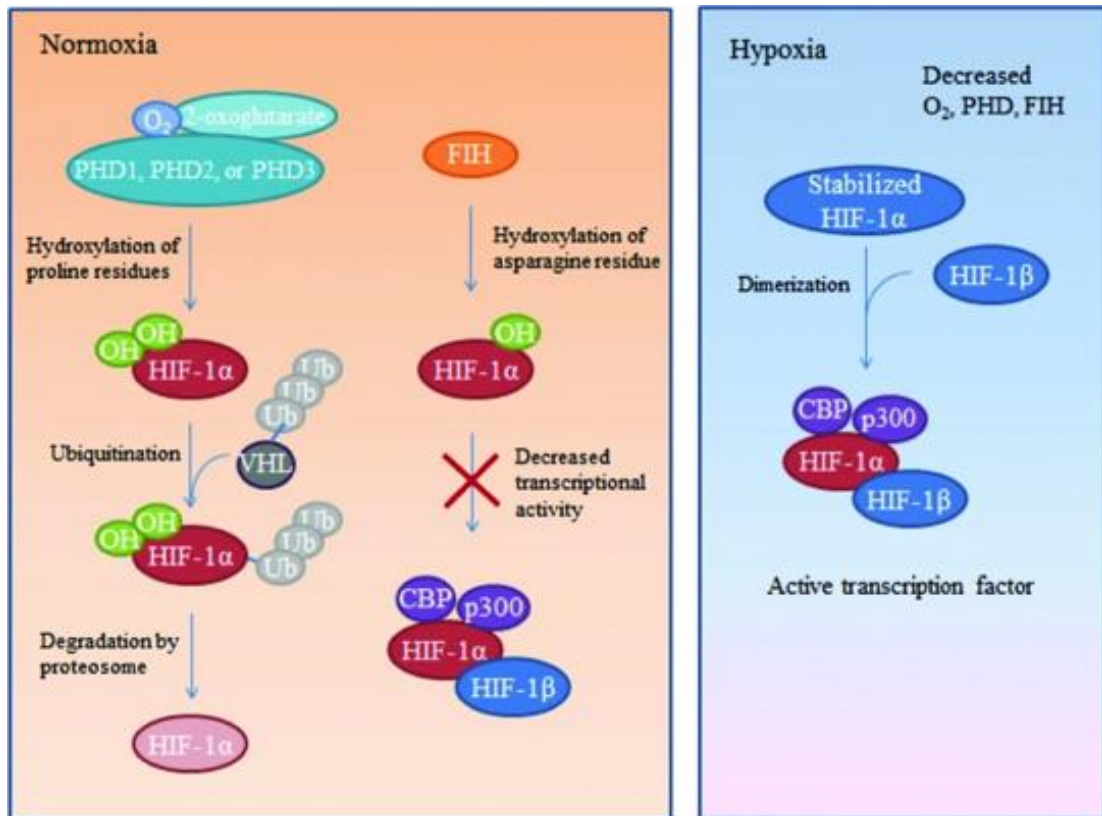


Figura 2. Mecanismos de degradação e estabilização de HIF-1 α (Hong et al., 2014).

A hipóxia também regula a expressão de metaloproteinases como MMP-9, levando a degradação da membrana basal e organização de pericítos. Células endoteliais especializadas conhecidas como *tip cells* migram através do gradiente de fatores angiogênicos, se diferenciando em células altamente proliferativas que irão formar a estrutura do novo vaso. O VEGF estimula a secreção da proteína delta-like 4 (DLL4), que estimula a diferenciação celular e suprime a proliferação. Outro fator importante, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) estimula a ligação do pericito às células endoteliais, reduz a proliferação e a sensibilidade ao VEGF. O fornecimento de sangue leva ao reestabelecimento da homeostasia do tecido (**Figura 3**).

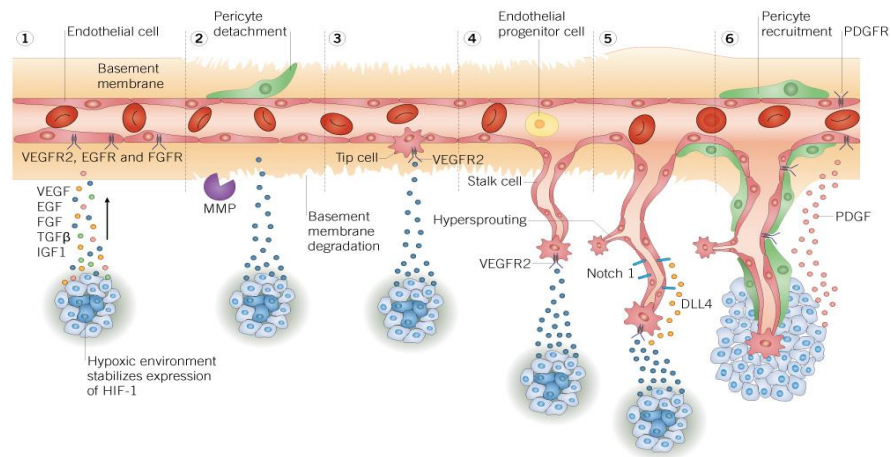


Figura 3. Processo da angiogênese (*Cancer Research Product, 2015*)

Dentre as diferentes moléculas que regulam a angiogênese, destaca-se o VEGF, uma família de glicoproteínas homodiméricas que atuam em diversos estágios da formação de novos vasos. Essa molécula age através de uma interação ligante-receptor (receptor do tipo tirosina-quinase), ativando vias que levarão à transcrição de genes envolvidos em processos como proliferação, migração, diferenciação de células endoteliais, reorganização de actina e controle da permeabilidade vascular. Além disso, ocorre a ativação de fatores de transcrição que levarão a produção de citocinas inflamatórias, as quais induzem a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, favorecendo a formação dos tubos (Aiello & Wong, 2000; Makanya et al., 2009; Gealekman et al., 2008).

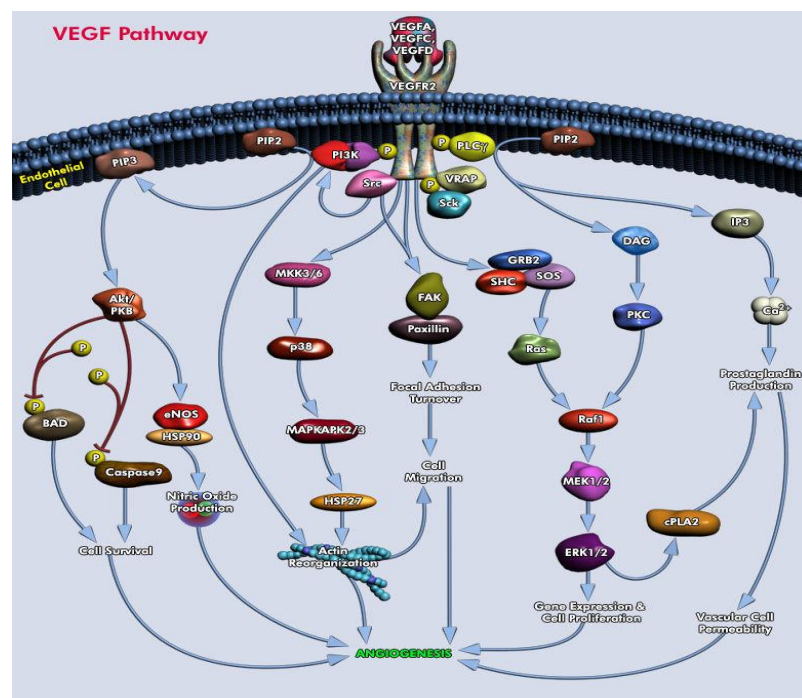


Figura 4. Via de sinalização do VEGF (Qiagen, 2009)

Dada a extrema relevância de se descobrir possíveis tratamentos que acelerem o processo de cicatrização de feridas, sabemos que os ácidos graxos podem atuar como imunomoduladores desse processo, podendo exacerbá-lo ou inibi-lo, dependendo do ácido graxo em questão, da dose/concentração e da condição analisada (Calder et al., 2015; Gorjão et al., 2009, Martins de Lima et al., 2007, Silva et al., 2018).

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos formados por átomos de hidrogênio e carbono. Eles são classificados como saturados quando não apresentam dupla ligação e insaturados quando possuem dupla ligação. Dentro do grupo dos insaturados existe uma classificação que considera o número de insaturações como os monoinsaturados, com uma dupla ligação (presente no óleo de oliva) e poliinsaturados, com duas ou mais duplas ligações. Ácidos graxos poliinsaturados são classificados pela posição da primeira dupla ligação contando a partir do grupo metil terminal. Assim, quando a primeira dupla ligação está no sexto carbono, o ácido graxo é chamado de ômega-6, ω -6, ou n-6, como o ácido linoleico (LA, C18:2 ω -6). Quando a primeira dupla ligação está no terceiro carbono, chamamos de ômega-3, ω -3, ou n-3 e quando a primeira dupla ligação está no nono carbono chamamos de ômega-9, ω -9, ou n-9 (Calder, 2011; Kaur, Chugh, Gupta; 2014).

Além da inflamação, os ácidos graxos podem regular o processo angiogênico, uma vez que, as células e mediadores lipídicos ou proteicos que atuam na resposta inflamatória são os mesmos que orquestram a angiogênese.

Estudos mostram que os ácidos graxos ω -3, proveniente dos óleos de peixes, possuem potente efeito anti-angiogênico inibindo a produção de mediadores como VEGF, PDGF e o fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas (PDEC GF), inibindo a produção de óxido nítrico, suprimindo assim a proliferação celular, migração, e a formação de tubos por células endoteliais (Spencer et al., 2009; Kang & Weylandt, 2008). Em contrapartida, o ácido linoleico (LA) parece estimular a angiogênese (Basak et al., 2013) com um efeito que parece ser indireto, uma vez que, quando metabolizado, o LA origina o ácido araquidônico (AA), que é responsável pela geração dos eicosanóides (Fritsche, 2008) que induzem a neovascularização, principalmente a prostaglandina E₂, através do aumento da produção de angiopoietina-2 (ANGPT-2) e metaloproteinases de matriz-9 (MMP-9) (Szymcsak et al., 2008).

Em estudos anteriores, observamos que a administração oral de ácido linoleico aumentou as concentrações de VEGF na pele, de ratos (Rodrigues et al., 2012). Recentemente, avaliamos os efeitos do linoleico sobre o processo de cicatrização em ratos diabéticos, e observamos melhora no fechamento das feridas, bem como aumento nas concentrações de

VEGF, na expressão gênica de angiopoietina e na formação de novos vasos na pele (Rodrigues et al., 2016). Assim, aventamos que os efeitos do linoleico sobre o processo de cicatrização podem ser decorrentes da sua influência sobre moléculas pró-angiogênicas favorecendo o formação de novos vasos e com isso melhorando o aporte de oxigênio e nutrientes no local da ferida.

2. HIPÓTESE

Considerando que o ácido linoleico modula o processo inflamatório, e que, as moléculas envolvidas na resposta inflamatória também desempenham funções na angiogênese, aventamos a hipótese de que o ácido graxo linoleico (LA) estimula a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, através da ativação da via do VEGF, com influência de HIF-1 α .

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar os efeitos, *in vivo e in vitro*, do ácido graxo linoleico sobre a angiogênese, e o envolvimento da via do VEGF/HIF-1 α nesses efeitos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a formação de vasos, por histologia, em animais controle ou suplementados oralmente com ácido graxo linoleico.
- Avaliar efeito suplementação oral com ácido linoleico em camundongos C57bl/6 sobre o a produção de citocinas como VEGF, TNF, IL-6 no tecido cicatricial de 0, 3, 7, 10 dias;
- Investigar os efeitos, *in vitro*, do ácido graxo linoleico sobre a migração e proliferação de células endoteliais;
- Determinar as concentrações de fator pró-angiogênico VEGF e espécies reativas de oxigênio (EROs) nos sobrenadante da cultura de células endoteliais;
- Avaliar atividade de HIF-1 α frente ao tratamento com linoleico, em camundongos *HIF reporter*;
- Avaliar a expressão de genes-alvo envolvidos na via de HIF-1 α .

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Comitê de ética

O projeto intitulado “Papel dos ácidos graxos na modulação da angiogênese e ativação de fagócitos” foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP n. 4778-1/2018). Foram utilizados camundongos *C57black/6*. Os animais foram mantidos em sala com temperatura aproximada de 23°C, 60% de umidade relativa, luz controlada com ciclo claro/escuro de 12 horas, e com água e comida *ad libitum*.

4.2 Administração oral do ácido graxo linoleico

Durante 5 dias os animais receberam oralmente 50 µL/dia de ácido graxo LA puro. Após a realização das feridas, a suplementação passou a acontecer 3x/semana, no intuito de reduzir o estresse do animal.

4.3 Modelo de indução de feridas e suplementação

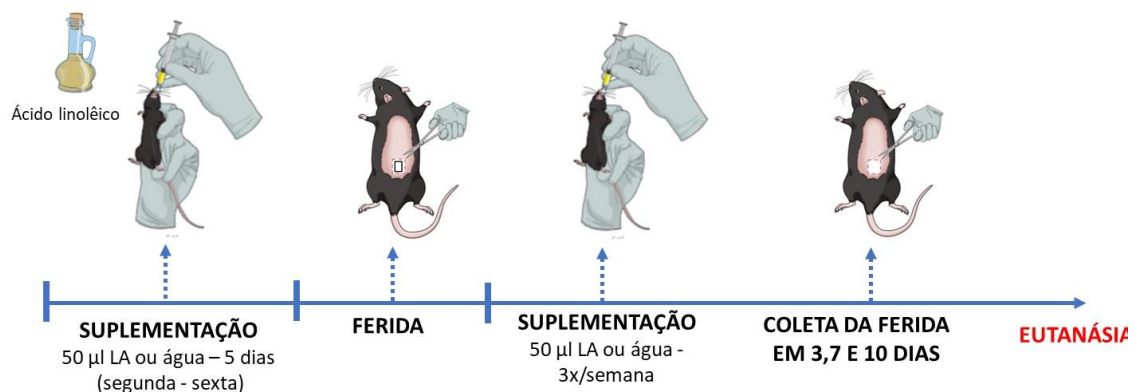


Figura 5. Desenho experimental.

Após o período de suplementação, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com xilazina e ketamina (2:1) e uma área de aproximadamente 1 cm² de pele foi removida cirurgicamente da região dorsal. Os tecidos cicatriciais foram coletados nos tempos 0, 3, 7 e 10 dias após indução da ferida (**Figura 5**).

4.4 Análises histológicas

O tecido cicatricial foi coletado, fixado em formaldeído 4% em solução tampão de fosfato 0,1M (pH 7,4), durante 24 horas à 8°C e incluído em Parafina (Paraplast-Sigma®). Secções de 5 µm em parafina foram coradas com hematoxilina e eosina para avaliar os aspectos gerais da ferida.

Os materiais foram documentados em microscópio estereoscópico Leica® (MZ10F) acoplado a câmera Leica® (DFC310 FX) e Microscópio Olympus® (U-LH100HG) com imagens representativas das estruturas histológicas registradas no sistema de captura e análise de imagens digitais (Câmera: Olympus® / U-TVO.63XC / T2).

4.5 Homogeneização do tecido cicatricial

Os tecidos coletados após a indução das feridas foram imediatamente acondicionados em gelo seco e mantidos no freezer (-80°C) até serem homogeneizados. Para homogeneização, os tecidos foram picotados manualmente com uma tesoura cirúrgica e em seguida, foram homogeneizados em PBS + inibidor de protease e centrifugados a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de *polytron* (*Kinematica Dispersing and Mixing Technology, Lucerne, Switzerland*), centrifugadas e o sobrenadante coletado para análises.

4.6 Produção de fator de crescimento e citocinas

No modelo de cicatrização *in vivo*, as concentrações de VEGF, TNF- α e IL-6 foram determinadas no homogenato do tecido cicatricial de 0, 3, 7, e 10 dias, como descrito anteriormente. No modelo *in vitro*, as concentrações de VEGF foram determinadas em sobrenadante das culturas celulares tratadas por 24 horas com variadas concentrações de LA (0 a 25 μ M). Ambos modelos tiveram a concentração de VEGF mensurada através do método de ELISA utilizando Kits Duo Set (*R&D System, Mineapolis, MN, USA*) e reveladas em espectrofotômetro Synergy HT (*Biotek, Winooski, VT, EUA*) com comprimento de onda de 450nm.

4.7 Isolamento de células endoteliais

A cultura celular foi estabelecida de acordo com protocolo previamente relatado por Chen et al. (1995) (**Figura 6**). Camundongos foram anestesiados ketamina (139,2 mg/kg de peso corporal) e xilazina (18,4 mg/kg de peso corporal) e eutanaziados por deslocamento cervical. Os pulmões foram removidos, lavados com meio de cultura composto por Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) com Pen Strep (penicilina e Streptomina) a 10.000 U/ml (*Gibco, Life Technologies, Waltham, MA USA*) e 20% de soro bovino fetal (*Gibco, Life Technologies, Waltham, MA USA*). Em seguida, foi cortado em pedaços de 1 mm³ em placa de 6 poços com 1mL do meio de cultivo, e mantido em estufa de CO₂ (Shellab, Sheldon

Manufacturing, Inc) a 5% de CO₂, 95% de umidade e 37°C por dois dias. Os pulmões foram descartados após 60h e o meio de cultivo foi trocado a cada dois dias. Células foram cultivadas até a confluência (no mínimo de 80%). Em seguida foi adicionado 1 ml/poço da enzima tripsina (2,5%) (Sigma-Aldrich, Germany) e incubado por 10 minutos em estufa para que houvesse o despreendimento das células. Após essa etapa as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 4 minutos a 4°C e o pellet ressuspensionado em 1ml de meio de cultivo. As células foram plaqueadas em garrafa de 25 cm². As células foram utilizadas até a 6^a passagem. Loiola et al (2013) mostraram que esse tipo de cultura celular exibia uma diminuição na taxa de proliferação celular e uma mudança na sua morfologia a partir da 6^a passagem.

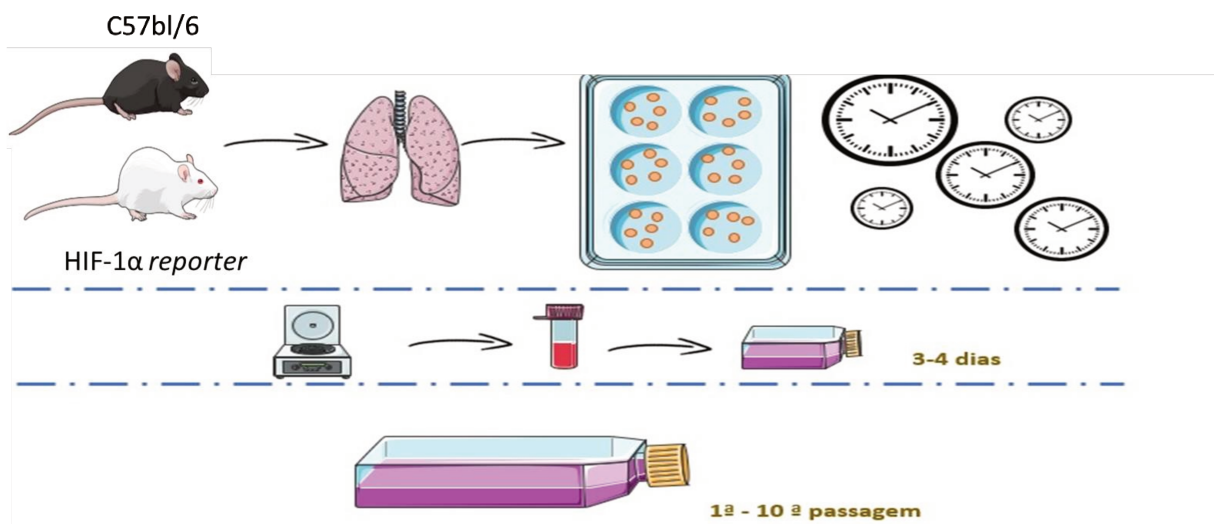


Figura 6. Esquema de obtenção de células endoteliais.

4.8 Caracterização da população celular por citometria de fluxo

Para caracterizar população de células obtidas com o protocolo descrito acima, foram realizadas análises de citometria de fluxo, com citômetro BD FACSVersé (BD Biosciences, EUA). Células (1×10^5 células por ml em PBS) foram incubadas com anti-CD45, anti-CD31 (molécula de adesão celular endotelial plaquetária; PECAM-1), CD309 (receptor 2 de fator de crescimento; VEGFR-2). Foram coletados 10.000 eventos. Foram realizados 3 experimentos independentes. Os resultados foram analisados utilizando-se o software FlowJo V10.

4.9 Ensaio de toxicidade por MTT

As culturas celulares foram tratadas com diferentes concentrações de LA (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 e 250 μ M) (Sigma-Aldrich, Germany) por 24h para avaliação de toxicidade por

meio de ensaio de MTT. Neste ensaio é quantificada a redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) por meio da atividade de desidrogenases mitocondriais. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular. A leitura foi feita em espectrofotômetro Synergy HT (Biotek, Winooski, VT, EUA) com comprimento de onda de 560nm.

4.10 Ensaio de viabilidade por Calceína AM

As células foram plaquedadas em placas de 96 poços, incubadas por 24h para que elas aderissem a placa. Após esse período, as células foram tratadas com variadas concentrações de linoleico e incubadas por mais 24h. No dia do experimento foi removido completamente o meio com tratamento e foi preparado uma solução em FluoroBrite DMEM Media (*Gibco, Life Technologies, Waltham, MA USA*) com 1 μ M/mL de Calceína AM (*Invitrogen, Waltham, MA USA*) e 1 μ g/mL de Hoetchst 33342 (*ThermoFischer, Molecular Probes, Waltham, MA USA*) e adicionado 50 μ L por poço. Incubou-se as células por 30 minutos em estufa. A leitura da fluorescência foi realizada em espectrofotômetro Cytation5 (*Biotek, Winooski, VT, USA*) com excitação em 494 nm e emissão em 517 nm e as imagens foram obtidas com lente objetiva de 4x com filtro de DAPI para a marcação positiva do núcleo com Hoetchst 33342 e GFP para marcação positiva da Calceína AM.

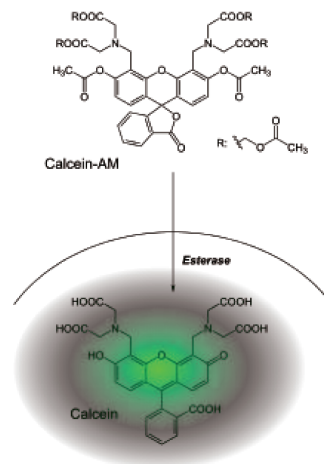


Figura 7. Esquema da reação de calceína- AM.

4.11 Ensaio de migração celular por “Scratch”

Para análise do perfil migratório das células endoteliais foi utilizado o método de “scratch”. Foram plaqueadas $1,5 \times 10^5$ células por poço (placa de 6 poços) e incubadas em estufa de CO₂ por 24 horas ou mais (até que atingissem 90% da confluência). O meio foi removido e os poços lavados com PBS autoclavado (tampão fosfato-salino). Com o auxílio de uma ponteira de 200µL foi feito o “scratch” no fundo da placa removendo fisicamente as células daquele local. Em seguida, os poços foram lavados novamente, e foram adicionados os tratamentos com ácido graxo linoleico e condição controle preparados em meio de cultivo com 5% de SBF. A migração de células foi acompanhada utilizando um leitor de microplaca com incubadora de CO₂ e temperatura controlada Cytation5 (*Biotek, Winooski, VT, USA*). As imagens foram capturadas automaticamente a cada 2 horas sempre no mesmo campo na lente de aumento de 4x. Com auxílio de uma ferramenta do software ImageJ chamada “MRI_Wound_Healing_Tool” foi medida a área da migração nos tempos de 0h, 6h, 12h, 24h, 48h. A primeira imagem obtida (tempo 0h) foi considerada 100% da área enquanto as demais imagens foram sempre comparadas com a sua própria área no tempo 0h.

4.12 Ensaio de proliferação celular por “Click it”

Em placa de 24 poços foram colocadas lamínulas redondas de 13mm Knittel® esterilizadas. Foram plaqueadas 4×10^4 células por poço e incubadas por 24 horas para que as células aderissem a lamínula. No dia seguinte, foram adicionados os tratamentos com ácido graxo linoleico e o reagente EdU e as células foram incubadas novamente mais 24 horas na estufa. Após esse período, o meio foi completamente retirado e as células fixadas com PFA 4% (paraformaldeído) por 15 minutos. Depois adicionou-se 0.5% de Triton X-100 (PBS) seguido por incubação de 20 minutos a temperatura ambiente. O mix da reação foi preparado e adicionado as lamínulas e incubado por 30 minutos. Após essa etapa foi feita a marcação com Hoechst 5 µg/mL e a montagem das lâminas com Mounting medium DAKO. As imagens foram analisadas em microscópio de fluorescência Cytation5 com filtro de contraste de fase, DAPI (Hoechst) e CY5 (Alexa Fluor). Foram feitas imagens de 3 campos distintos para posterior análise da média do número de células coradas com DAPI e com CY5. O número de células coradas com DAPI e CY5 foi contado automaticamente pelo software Gen 5 3.0 (*Biotek, Winooski, VT, USA*). O número de células coradas com DAPI foi considerado como 100%, enquanto o número de células marcadas com Cy5 foi considerado com “x”, ou seja % de proliferação.

4.13 Produção de espécies reativas de oxigênio

Para análise da produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) foi utilizado o kit Amplex® de Peróxido de Hidrogênio Vermelho/Peroxidase (*ThermoFischer, Molecular Probes, Waltham, MA USA*) que utiliza o reagente Amplex® Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) para detectar peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O reagente Amplex® Red, em combinação com horseradish peroxidase (HRP) é capaz de detectar H₂O₂ liberado por amostras biológicas. Assim, as células foram pré-tratadas por 24 horas com ácido graxo linoleico, em variadas concentrações, e a produção de peróxido de hidrogênio foi medida com relação a sua absorbância no período de 30 minutos (medido a cada 5 minutos) em espectrofotômetro Biotek em um comprimento de onda de 560nm.

4.14 Cultura de células endoteliais de animais HIF-1 α luciferase

Para melhor explorar o papel de HIF-1 α foram utilizados camundongos Odd-luciferase (FVB.129S6Gt(ROSA)26Sor^{tm2(HIF1A/LUC)Kael/J}) que possuem a porção C-terminal do domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD) do fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF-1 α) ligado ao gene luciferase. Esses animais foram adquiridos da Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) para serem utilizados como reporter de HIF-1 α . Foram coletados os pulmões desses animais conforme protocolo descrito acima, e as células foram plaqueadas em uma concentração de 2×10^4 por poço e tratadas por 4h com LA a 10 e 25 μ M. Também foi utilizado como controle positivo desse experimento o BAY 85-3934 (5 μ M) (*Cayman Chemical, Michigan, USA*). O sobrenadante foi descartado e as células foram extraídas com tampão de lise e β -Mercaptoetanol e mantido em -20C. Para avaliar se a atividade HIF-1 α estava aumentada ou não, em relação ao tratamento com LA, utilizou-se o kit Dual Luciferase Reporter Assay System (*Promega*) em uma reação enzimática onde em uma placa branca adicionou-se 20 μ L de amostra mais 50 μ L do substrato da reação, e revelou a luminescência em espectrofotômetro (*Biotek, Winooski, VT, EUA*) no comprimento de onda de 590/35 e ganho de 150. Neste ensaio avaliamos a produção de HIF-1 α estabilizada, uma vez que a luminescência possui relação direta com a estabilização de HIF-1 α , que é a subunidade mais instável do complexo HIF, ligada ao domínio de degradação do oxigênio (ODD), medida pela atividade de luciferase. Para realizar as análises dos valores obtidos as amostras foram normalizadas pelo seu próprio valor de proteína através do método de Bradford (Bradford, 1976) e comparadas com o grupo controle, sem tratamento.

4.15 Análise da expressão gênica por qRT-PCR

Foram avaliados a expressão de genes alvo de HIF-1 α nas células endoteliais primárias tratadas por 24h com 10 μ M e 25 μ M de LA por reação em cadeia da polimerase em tempo real. Para tanto, o RNA foi extraído utilizando microcolunas de purificação do mini kit PureLinkTM RNA (Ambion), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, o RNA foi quantificado por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm e o grau de pureza determinado pelo razão 260/280 nm. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μ g do RNA total extraído utilizando o kit High Capacity cDNA reverse transcription da Applied Bioscience (Life Technologies) e a quantificação da expressão gênica foi determinada por PCR em tempo real através do equipamento/software Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System utilizando SYBRTM Green Master Mix como fluoróforo (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e pares de primers específicos para os genes analisados (**Tabela 1**). Além disso, as amostras tiveram a expressão relativa de seus genes determinada utilizando a fórmula 2-DDCt e os valores obtidos para o gene *housekeeping* β 2m.

Tabela 1. Sequências de primers. Sequência sense e anti-sense de primers para avaliar a expressão gênica das amostras de células endoteliais tratadas com LA.

GENE	SENSE	ANTI-SENSE
<i>Vegf</i>	ATCGTCACCGTTGACAGAACA	GGCATCCGAGTGAGGACATC
<i>Hif-1α</i>	ATCTCGGCGAAGCAAAGAGTC	TGGGGAAGTGGCAACTGAT
<i>Glut-1</i>	CTTTGTGGCCTTCTTGAAGT	CCACACAGTTGCTCCACAT
<i>Tgf-β</i>	CGCGAATGTCTGACGTATTCAAG	CGCCAACAACGCCATCTATG
<i>Pfkb-3</i>	GGAGGTCGGCATGTTGAAGA	CTTTGGAAGGGCCTGAGAGG
<i>iNos</i>	GCAAACATCACATTC AGATCCC	TCAGCCTCATGGTAAACACG
<i>Caderina</i>	CCTGTCTTCAACCCAAGCAC	CAACAACGAACTGCTGGTCA
β 2M	CCCCACTGAGACTGATACCATACG	CGATCCCAGTAGACGGTCTTG

4.16 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão da média. Comparações entre dois grupos foram realizadas por teste t de *student*. Para análises de mais de dois grupos foram realizados teste One-way ANOVA e pós teste Dunnett's. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa Prisma 5.0 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA*).

5. RESULTADOS

5.1 Análise qualitativa do tecido cicatricial

Inicialmente, avaliamos se a suplementação com ácido graxo linoleico seria capaz de aumentar a vascularização durante a fase proliferativa do processo de cicatrização. Para tanto, coletamos os tecidos cicatriciais de 7 e 10 dias e realizamos as análises histológicas. Como pode ser observado na **Figura 8**, animais do grupo LA apresentaram mais vasos (indicados pela letra V), menor edema e menor infiltrado inflamatório, caracterizando um favorecimento da angiogênese, quando comparados aos animais do grupo controle (C).

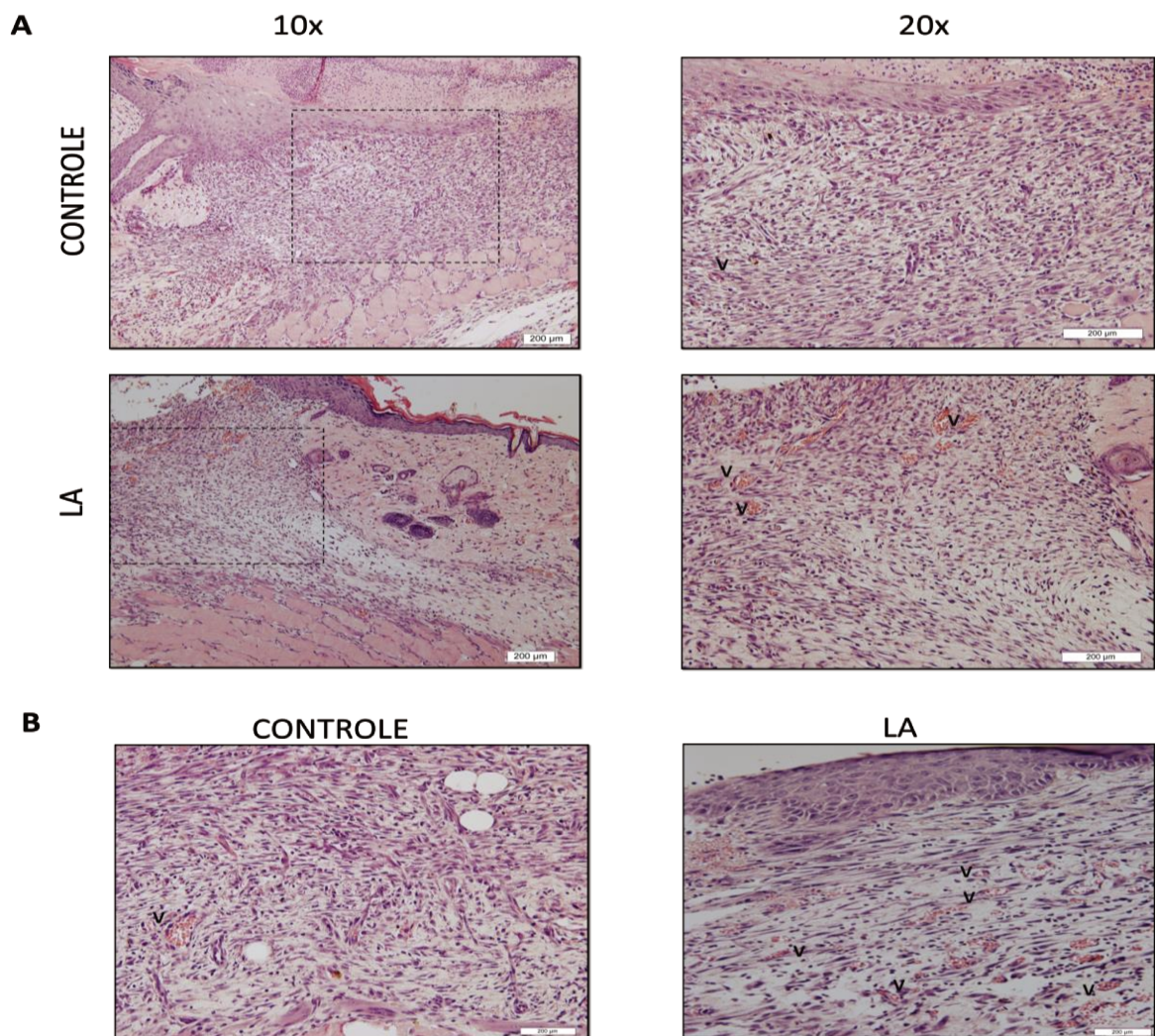


Figura 8. Corte histológico corados com HE na região de transição entre borda e ferida. **(A)** Imagens no aumento de 10x e 20x da região de transição do grupo controle e LA, onde (V) indicam vasos. **(B)** Imagem da região da ferida do grupo controle e LA. Imagem representativa.

5.2 Perfil de citocinas em tecido cicatricial de camundongos

Em seguida, avaliamos temporalmente, a produção de citocinas envolvidas com a formação de vasos. Assim, pode-se observar que a suplementação oral com LA foi capaz de aumentar as concentrações de VEGF em 10 dias, TNF- α em 3 e 10 dias, e IL-6 em 7 dias após a indução da ferida (**Figura 9**).

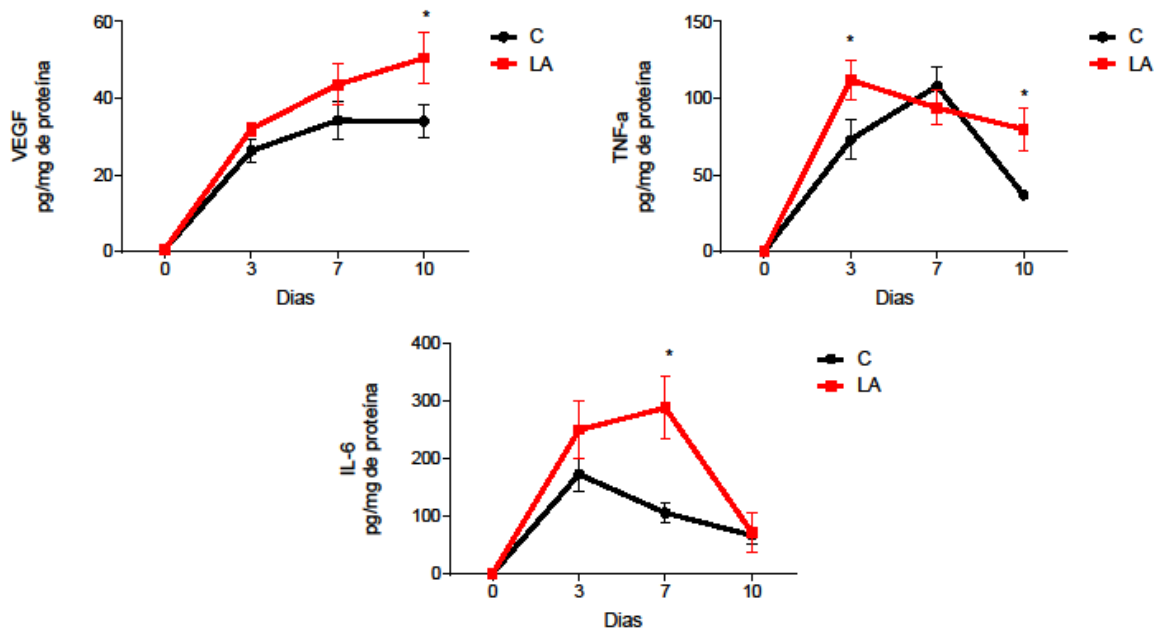


Figura 9. Perfil de citocinas mensurado pelo método de ELISA, em tecido cicatricial de camundongos suplementados. Concentrações do VEGF, TNF- α e IL-6 no tecido cicatricial coletado de animais controle (C) e suplementados com linoleico (LA). As amostras foram coletadas nos tempos 0, 3, 7 e 10 dias após a indução das feridas. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão da média de 7-11 animais por grupo. Teste estatístico de Two-way ANOVA e pós teste Dunett.

Considerando os resultados obtidos, iniciamos os experimentos *in vitro* para melhor elucidar os efeitos do linoleico sobre a angiogênese.

5.3 Caracterização da população celular por citometria de fluxo

Inicialmente foram realizados ensaios para caracterização da população celular obtida por meio citometria de fluxo (BD FACSVerse, BD Biosciences, EUA) com anticorpos

específicos para células endoteliais como CD31 (PECAM-1) e CD309 (receptor de VEGF) e CD45, um marcador de leucócitos gerais, utilizado para exclusão de células não endoteliais.

Com este painel, 74,6% das células foram negativas para CD45 e dessas, 85,75% foram duplo positivas para PECAM-1 (CD31) e VEGFR-2 (CD309) (**Figura 10**), sendo então caracterizadas como endoteliais.

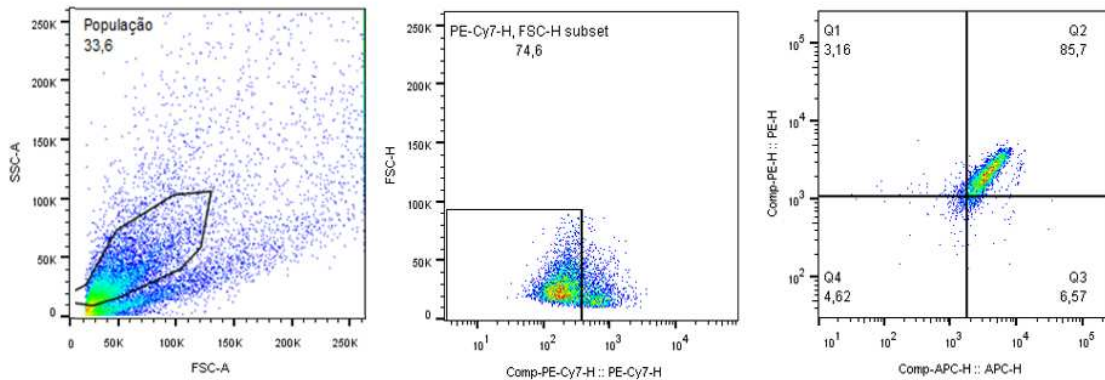


Figura 10. Caracterização celular por citometria de fluxo. Células foram incubadas com anticorpos anti- PECAM-1 (CD31), VEGFR-2 (CD309) e marcadores hematopoiéticos (CD45). Foram realizados 3 experimentos independentes.

5.4 Altas concentrações de linoleico são tóxicas às células endoteliais.

Para determinar a maior concentração de LA que não seria tóxica para as células endoteliais, utilizamos duas metodologias diferentes. Através do MTT, apenas a concentração de 250 μ M de LA, após incubação por 24 horas, causou toxicidade e perda de viabilidade (**Figura 11 A**).

Em células vivas, a Calceína-AM (não fluorescente) é convertida em Calceína (verde fluorescente), após hidrólise do éster acetoximetílico por esterases intracelulares (**Figura 7**). Esse derivado acetometoximetílico da calceína (calceína AM) é usado em biologia já que pode ser transportado através da membrana celular de células vivas. O grupo acetometóxi torna escuro a parte da molécula que forma quelato com cálcio. Após o transporte na célula, esterases intracelulares removem o grupo e a molécula liga-se ao cálcio no interior da célula (resultando em uma forte fluorescência verde), e aprisionada ali. Como células mortas perdem esterases ativas, somente células vivas são marcadas.

Pelo método de Calceína AM, 100 e 250 μ M de LA reduziram a viabilidade celular (**Figura 11 B**). Neste mesmo ensaio, foram realizadas imagens em microscópio de fluorescência Cytation 5, onde foi possível observar, de forma qualitativa, o efeito tóxico causado às células quando tratadas com altas concentrações de LA, reduzindo a marcação de núcleo (marcado com Hoechst) e citoplasma (marcado com Calceína) (**Figura 11 C**).

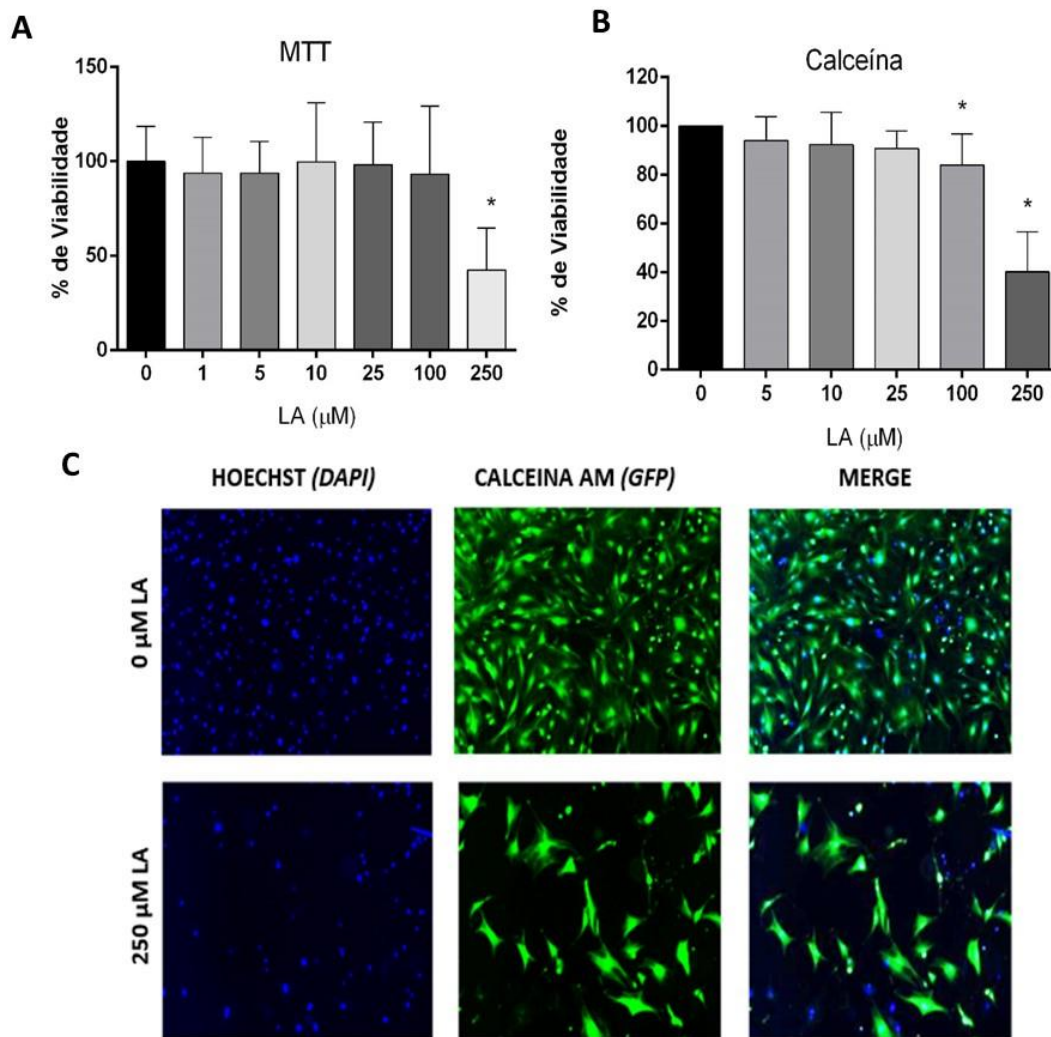


Figura 11. Análise da toxicidade de LA. (A) Citotoxicidade do tratamento com LA por MTT. (B) Porcentagem de células viáveis, por Calceína-AM, tratadas com LA. Resultados normalizados pelo controle sem tratamento apresentados como média \pm desvio padrão. 4 experimentos em triplicata. (*) Diferença significativa em relação ao 0 μ M. Teste estatístico *One-way ANOVA* e pós teste *Dunnnett's*. (C) Microscopia de fluorescência com Calceína-AM. Imagens representativas de células sem tratamento (controle) e tratadas com alta concentração de LA (250 μ M LA) marcadas com Hoescht (DAPI, azul) e calceína-AM (GFP, verde).

Considerando os resultados de viabilidade e toxicidade, as demais análises foram realizadas com concentrações não tóxicas para as células endoteliais, o que nos assegura que os efeitos observados não são decorrentes de processos de morte celular.

5.5 Tratamento com LA não altera migração celular

Um dos processos envolvidos na angiogênese é a migração das células endoteliais para o local onde os novos vasos serão formados. Assim, avaliamos se o tratamento *in vitro* com LA modificaria esta resposta das células endoteliais. Para tanto, utilizamos o ensaio de *scratch*.

As concentrações utilizadas de LA não alteraram a migração celular, avaliada por ensaio de *Scratch*, (Figura 12 A e 12 B).

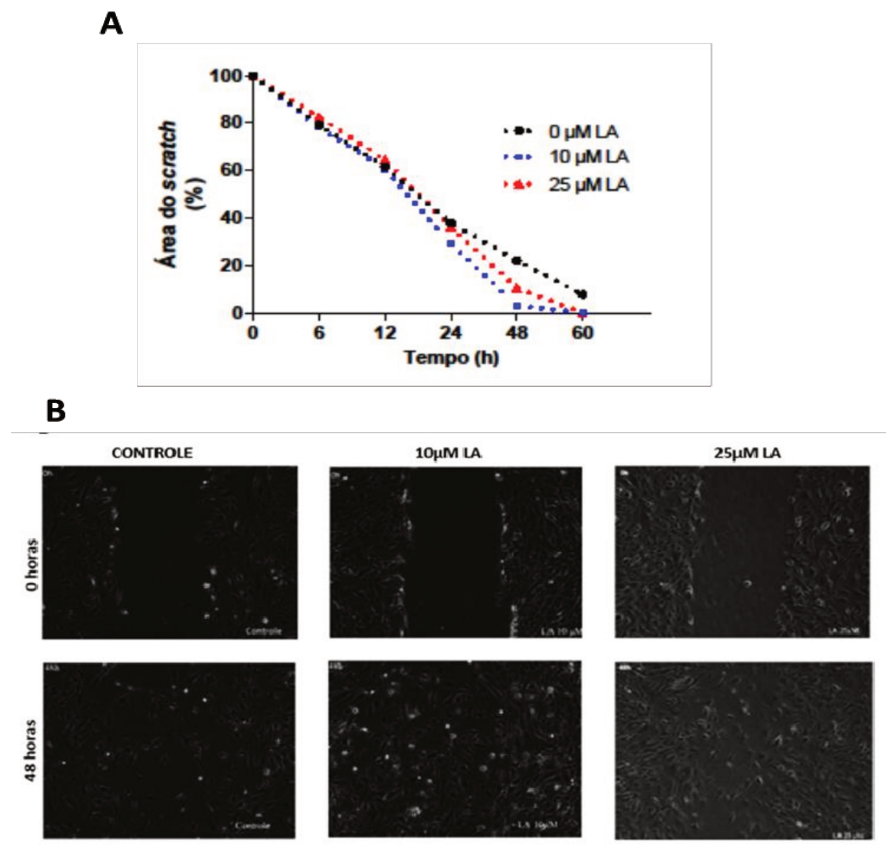


Figura 12. Análise da migração celular. (A) Análise da porcentagem da área de migração celular (*Scratch*). (B) Imagens representativas da migração celular. Células sem tratamento (controle), 10μM e 25μM de LA nos tempos de 0h e 48h. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão como média de 5 experimentos em duplicata.

5.6 Tratamento com LA aumenta a proliferação celular

A proliferação celular foi determinada através do ensaio com “Click-iT Plus EdU imaging kit Alexa Fluor 647” (*ThermoFischer, Molecular Probes, Waltham, MA USA*) que permite a visualização da proliferação através da incorporação da molécula de EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), um nucleósido análogo a timidina que é incorporado ao DNA durante a sua síntese, ligado a um corante Alexa Fluor®.

As células endoteliais tratadas com 10 μM de LA aumentaram sua proliferação, por ensaio de Click it (**Figura 13**).

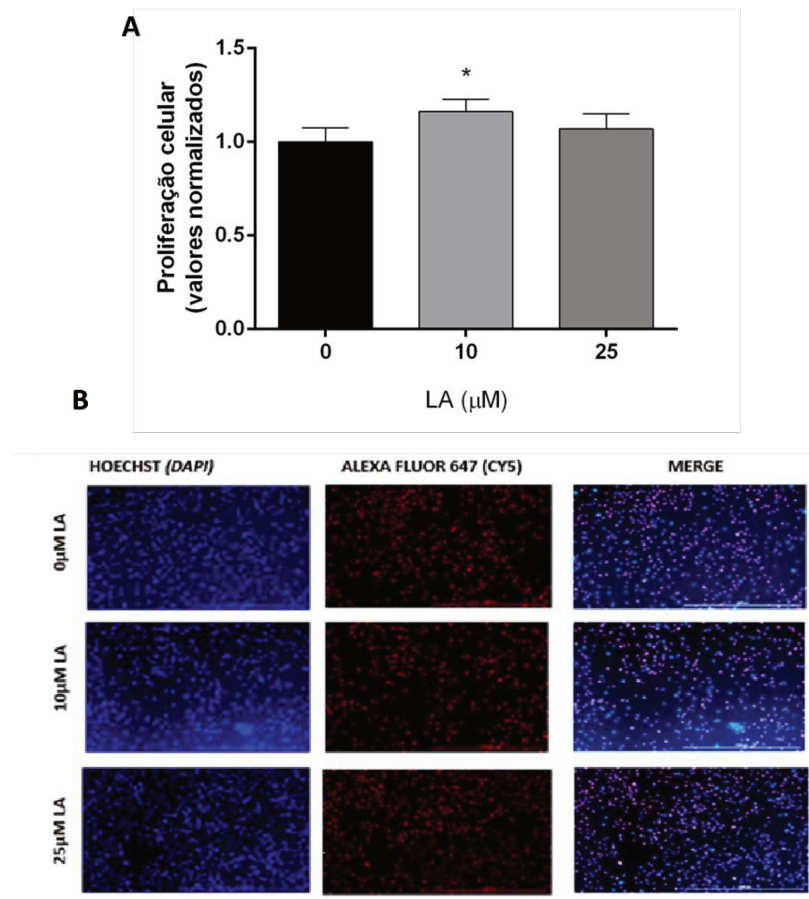


Figura 13. Análise da proliferação celular. **(A)** Porcentagem de proliferação celular após tratamento com LA. **(B)** Imagens representativas de células endoteliais primárias sem tratamento (controle), ou tratadas com 10 μM de LA e 25 μM de LA, por 24, e marcadas com Hoechst (DAPI), e Alexa fluor 647 (CY5). Resultados apresentados como média \pm desvio padrão de 2 experimentos em duplicata. (*) Diferença significativa em relação ao 0 μM . Teste estatístico *One-way ANOVA* e pós teste de *Dunnett's*.

5.7 LA aumenta produção de VEGF

Assim como em animais tratados oralmente com LA, foi possível observar um aumento nas concentrações de VEGF nas células endoteliais tratadas com 25 μ M de LA, (**Figura 14**).

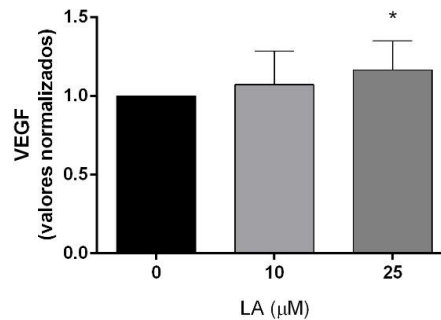


Figura 14. Concentrações do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) no sobrenadante de células endoteliais primárias tratadas com diferentes concentrações de ácido linoleico (LA), durante 24 horas. Resultados apresentados como média \pm desvio-padrão de 11 experimentos em duplicatas. (*) Diferença significativa do 0 μ M. Teste estatístico de *One-way ANOVA*, e pós teste de *Dunnett's*.

5.8 LA reduz a produção de espécies reativas de oxigênio

LA também foi capaz de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) medida através da sonda Amplex Red (**Figura 15**).

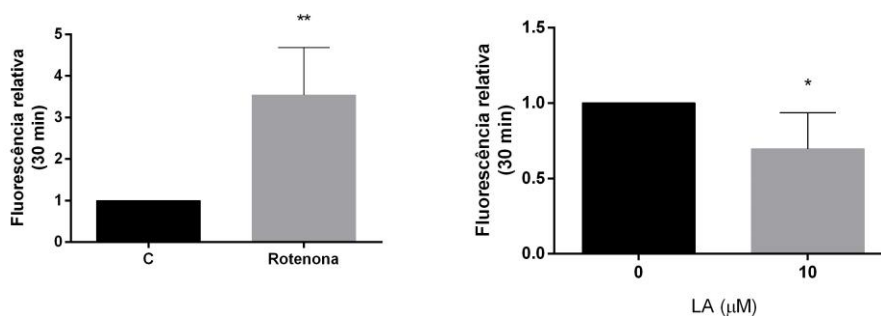


Figura 15. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células endoteliais. Resultados apresentados como média \pm desvio-padrão de 4 experimentos em triplicata. (*) Diferença estatística entre o grupo sem tratamento e tratado com 10 μ M de LA. (#) Diferença estatística entre o grupo sem tratamento e o tratado com Rotenona, um inibidor

sintético do complexo I de produção de ATP. Teste estatístico teste *T Student* entre 0 μM e 10 μM de LA, e 0 μM de LA e Rotenona.

5.9 LA aumenta a produção de HIF-1 α estável em camundongos *reporter*

Considerando os resultados apresentados hipotetizamos se esses efeitos seriam decorrentes da ativação da via de HIF-1 α . Para confirmarmos essa hipótese, realizamos ensaios de atividade de Luciferase em células endoteliais isoladas de animais *HIF luciferase reporter* tratadas com linoleico.

As células tratadas com 25 μM de LA, por 4h, aumentaram a estabilidade e consequente produção de HIF-1 α . (**Figura 16**).

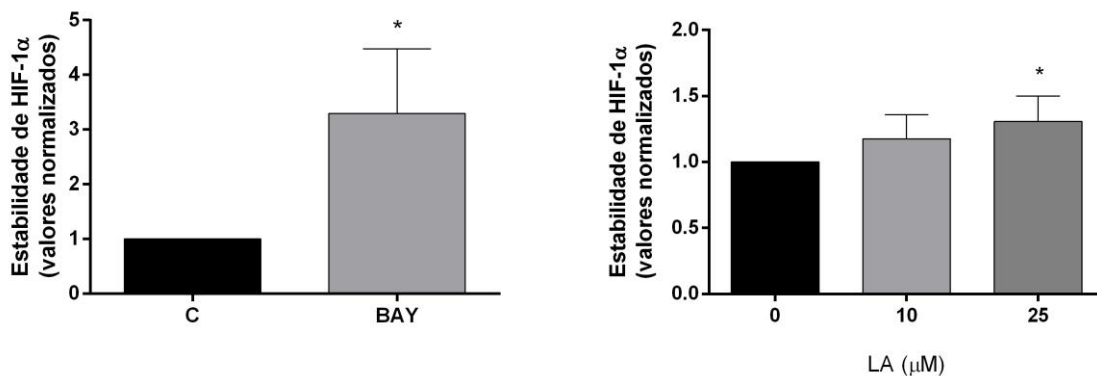


Figura 16. Estabilidade de HIF1 α em células endoteliais de camundongos *HIF1 α reporter* tratadas com BAY e Linoleico. 6 experimentos em duplicatas. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. (*) Diferença significativa entre o controle (sem tratamento) e 10 μM de linoleico. (#) Diferença significativa entre BAY (estabilizador sintético de HIF1 α , em normóxia). Teste estatístico *One-way ANOVA* e pós teste de *Dunnett's*.

5.10 LA aumenta expressão gênica de genes alvo de HIF-1

O aumento na atividade da proteína de HIF foi corroborado pela, também, elevação na expressão gênica de *Hif-1 α* (**Figura 16**), assim como o aumento da expressão do mRNA de *Vegf* foi corroborada pelo aumento de VEGF (**Figura 8**). Outros genes relacionados com o favorecimento da angiogênese também estavam aumentados, como *Glut-1*, *Tgf- β* , *Pfkb-3* (**Figura 17**).

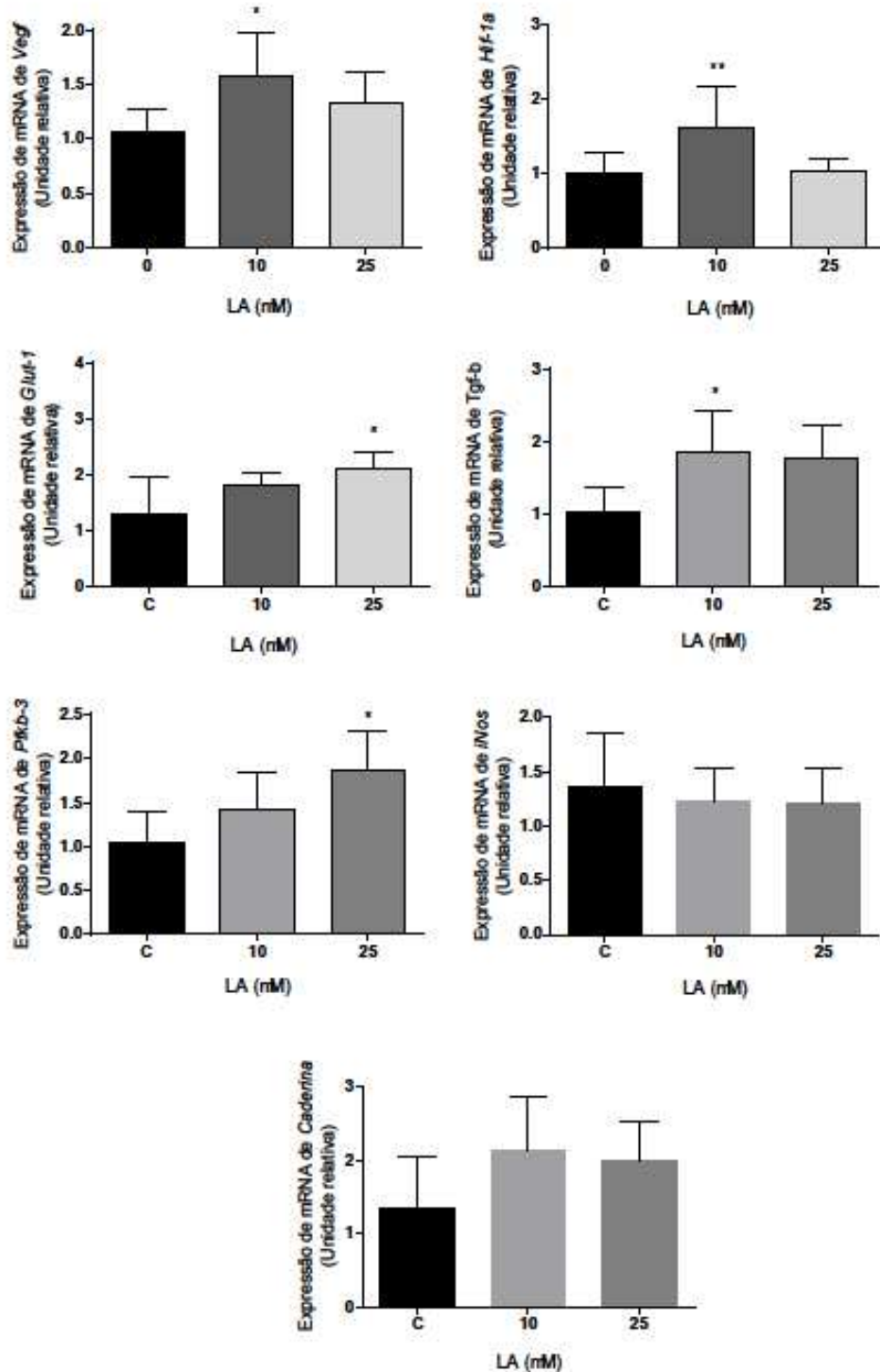


Figura 17. Expressão relativa de genes-alvo de HIF-1 α em células endoteliais. Expressão relativa de *Vegf*, *Hif-1 α* , *Glut-1*, *Tgf- β* , *Pfkfb-3*, *Inos*, *Caderina*. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão de 7 experimentos em duplicata. (*) Diferença significativa em relação ao controle. Teste estatístico One-way ANOVA e pós teste de *Dunnnett's*.

6. DISCUSSÃO

Considerando a importância da adequada vascularização para o processo de reparo tecidual, nosso grupo tem investigado os mecanismos pelos quais os ácidos graxos podem induzir a formação de vasos durante a cicatrização de feridas cutâneas.

No presente trabalho, demonstramos que a administração oral com ácido linoleico aumentou a vascularização do tecido cicatricial. Este efeito parece estar associado com uma ação pró-angiogênica deste ácido graxo nas funções de células endoteliais, uma vez que ele aumentou a proliferação destas células e elevou as concentrações de fatores pró-angiogênicos, como VEGF, TNF- α e IL-6. O mecanismo envolvido nestes efeitos celulares parece ser via ativação de HIF-1 α . Entretanto, não descartamos que outros mecanismo possam estar envolvidos nessas ações.

Tradicionalmente algumas terapias utilizadas no tratamento de feridas se baseiam na aplicação tópica de pomadas ricas em ácidos graxos. Essas terapias justificam-se pela barreira física criada, evitando-se assim a entrada de microrganismos e a perda de água para o meio externo (Worley, 2006). Além disso, sabemos que os ácidos graxos regulam o processo inflamatório podendo exacerbá-lo ou inibi-lo, dependendo do ácido graxo em questão, da dose/concentração e da condição analisada (Calder et al., 2015; Gorjão et al., 2009, Martins de Lima et al., 2007).

A angiogênese é um processo complexo que envolve a produção de diversos fatores pró-angiogênicos como o VEGF, PDGF e FGF que atuam modulando diferentes funções celulares como migração, proliferação e a organização das células endoteliais em formato de tubos (Carmeliet, 2000).

Os efeitos dos ácidos graxos sobre a angiogênese já vem sendo estudados há alguns anos e em diferentes modelos. Em modelo animal como o zebrafish (*Danio rerio*), foi observado que o LA aumentou a proliferação de células endoteliais e com isso favoreceu o reparo tecidual (Rojo et al., 2010). Em modelo de cicatrização, em camundongos Balb/c, foi observado que nos animais tratados topicamente com LA, houve aumento nas concentrações de óxido nítrico (NO) no local da lesão (Frank et al., 2002). O NO é um radical livre, produzido no início da resposta inflamatória, que atua nos vasos sanguíneos aumentando o seu calibre e assim favorece a migração de células, e o aporte de nutrientes e oxigênio para o local da inflamação. As células endoteliais são ao mesmo tempo produtoras e células-alvo do NO (Gao et al., 2019). Nestas células, NO induz a migração, proliferação e diferenciação, além da interação com a matriz extracelular, eventos fundamentais para a formação de novos vasos (Fraisl, 2013; Kruzliak &

Koyacova, 2013; Ziche, 2009; Sessa, 2009; Singh & Agarwal, 2007; Roberts et al., 2007; Morbidelli, Donnini, Ziche, 2004; Morbidelli, Donnini, Ziche, 2003).

Em trabalhos anteriores demonstramos que a administração oral com LA foi capaz de aumentar a produção de fatores pró-angiogênicos (Rodrigues et al., 2012) e o número de vasos (Rodrigues et al., 2016) durante a cicatrização de feridas em ratos. Assim, os resultados aqui apresentados corroboram com os achados anteriormente descritos na literatura. Além desse aumento na vascularização, no presente trabalho a administração oral de LA elevou as concentrações de VEGF, TNF- α e IL-6 (**Figura 9**).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que atua sobre as células endoteliais aumentando a expressão de moléculas de adesão, o que impulsiona a migração de neutrófilos e macrófagos para o local da lesão (Rodrigues et al., 2012). Estas células, entre outras funções, vão produzir o VEGF e a IL-6, as quais também atuam nas células endoteliais promovendo a proliferação, diferenciação e a organização em tubos (Bao et al., 2009; Bergman et al., 2017). Além disso, estudos demonstram que o tratamento de células endoteliais com TNF- α ativa NF- κ B e, assim, aumenta a expressão de HIF-1 α (Jin et al., 2019). Estes efeitos resultaram na expressão de TNF- α e VEGF e ainda induziram a angiogênese. Assim, este estudo demonstra um importante link entre hipóxia/TNF- α /angiogênese (Jin et al., 2019).

O aumento de TNF- α induzido pelo LA, observado *in vivo*, pode ser explicado por alguns mecanismos como: aumento na geração de ácido araquidônico (AA) e consequente produção de eicosanoides pro-inflamatórios, os quais induzem a produção de TNF- α ; ativação da via de NF- κ B, pelo LA, resultando em maior produção da citocina pro-inflamatória; entre outros. Entretanto, este estudo não avaliou como o LA poderia elevar as concentrações de TNF- α . Assim, outros estudos são necessários para responder este ponto.

Outra importante citocina envolvida na angiogênese é a IL-6. A IL-6 pode atuar nas células-alvo através de dois mecanismos: a via clássica e a via cruzada. Na via clássica, a IL-6 liga-se ao seu receptor de membrana (IL-6R), expresso em células do sistema imune, hepatócitos e outros tipos celulares. O complexo IL-6/IL-6R recruta a glicoproteína 130 (gp130) e este novo complexo ativa a cascata de sinalização de IL-6 induzindo a expressão de genes pro-inflamatórios. Por outro lado, células que não expressam o IL-6R podem responder a IL-6 através da ativação cruzada. Resumidamente, o IL-6R expresso nas membranas de leucócitos, por exemplo, é clivado gerando a forma solúvel do IL-6R (sIL-6R). A IL-6 produzida pode ligar-se, no meio extracelular, ao sIL-6R e assim formar o complexo IL-6/sIL-6R. Este complexo recruta gp130, presente nas membranas celulares, e assim ativa a cascata de

sinalização conhecida como cruzada (Scheller et al., 2011). Esta via cruzada parece ser a mais relevante em relação ao reparo tecidual e a angiogênese (Bergman et al., 2017). Em modelo *in vitro* de hepatocarcinoma, foi demonstrado que a ativação cruzada de IL-6 aumentou a formação de tubos, o espraiamento e a proliferação de células endoteliais. O mesmo não foi visto quando avaliou-se apenas a ativação clássica da IL-6 (Bergman et al., 2017).

O VEGF modula diversos processos envolvidos na angiogênese. Por exemplo, sua ligação com o receptor KDR estimula a produção de NO e prostaciclina, os quais induzem vasodilatação e aumentam a permeabilidade vascular (van der Zee et al., 1997). Ele também aumenta a degradação da membrana basal, facilitando assim o movimento das células endoteliais. Este efeito é resultante do aumento na expressão de MMPs e TIMPs, as quais regulam a degradação da matriz extracelular (Wang et al., 1998). Além disso, o VEGF aumenta a migração das células endoteliais por induzir a expressão de integrinas bem como elevar a produção dos ligantes das integrinas, como a osteopontina, a qual se liga na integrina $\alpha_v\beta_3$ (Senger et al., 1996). Por fim, VEGF inibe a senescência e aumenta a capacidade proliferativa das células endoteliais (Watanabe et al., 1997; Fritsche, 2008; Szymcsak *et al.*, 2008).

Desta forma, o aumento na vascularização observado nas feridas de animais tratados oralmente com LA pode ser justificado pelo aumento nas citocinas acima citadas.

Para melhor compreendermos os mecanismos pelos quais o LA modula a angiogênese, decidimos avaliar em modelo *in vitro*, os efeitos do LA sobre a angiogênese. Para tanto, foi utilizado um modelo explante pulmonar de camundongos para a obtenção das células endoteliais, como descrito por Chen, Fei, Li, (1995).

Diversos protocolos têm sido propostos para avaliar a angiogênese, sendo o mais comum o uso de células primárias derivadas da aorta. Entretanto, optamos por isolar as células da microcirculação pulmonar por elas terem morfologia e funções mais próximas das células endoteliais do capilares da pele. Assim, nossos ensaios de caracterização da população celular isolada, confirmaram grande pureza das culturas celulares (**Figura 10**), considerando que 74,6% eram negativas para CD45, e mais de 85% das células eram duplo-positivas para marcadores exclusivos de endotélio (CD31 e CD309) (Nasdala *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003). Estes resultados corroboram os apresentados por Loiola et al., (2013), validando o modelo experimental.

Considerando os resultados de viabilidade e toxicidade (**Figura 11**), as demais análises foram realizadas com concentrações não tóxicas (10 e 25 μM) para as células endoteliais, o que nos assegura que os efeitos observados não são decorrentes de processos de morte celular.

A relação *tip cell/stalk cells*, gerada na angiogênese fisiológica, é modulada indiretamente pelo VEGF, uma vez que após a ligação com o seu receptor (VEGFR) ocorre aumento na expressão da proteína Delta-like-4 (Dll-4) a qual regula esta relação (Phng et al., 2009). Assim, apesar de fundamental para a angiogênese, nem todas as células endoteliais proliferam. Este fato, reforça a importância do aumento na taxa de proliferação induzida pelo tratamento *in vitro*, das células endoteliais, com o LA (**Figura 13**). Este efeito pode ser explicado pela elevação na porcentagem de células na fase S do ciclo celular, observado em células satélite, após tratamento com LA (Belal et al., 2018).

De modo inesperado, o tratamento *in vitro* com LA reduziu a produção de EROs (**Figura 15**). Este resultado pode ser explicado devido a grande instabilidade desses compostos em relação a metodologia pela qual são avaliados (Hatanaka et al., 2006). Outros estudos, que avaliaram a produção de EROs frente ao tratamento com linoleico, mostraram aumento nas concentrações do ânion superóxido e de H₂O₂ de um modo dose-dependente (Nakamura *et al.*, 2003; Hatanaka *et al.*, 2006). Essas diferenças podem ser decorrente dos tipos celulares estudados (fibroblastos e células endoteliais) bem como as técnicas utilizadas.

Considerando que a ferida é um ambiente hipóxico, devido a ruptura da vasculatura local, e que a angiogênese é um processo fortemente regulado pela hipóxia, investigamos se o tratamento *in vitro* com LA poderia modular a atividade de HIF-1 α . Assim, como observado na **Figura 16**, LA aumentou a atividade de HIF-1 α o que foi corroborado pelo aumento na expressão de genes-alvo de HIF (**Figura 17**).

A angiogênese decorrente da hipóxia representa uma das mais importantes respostas adaptativas frente a baixa disponibilidade de oxigênio (Bikfalvi, 2017). Este processo é regulado pelas diferentes isoformas de HIF, sendo que as principais envolvidas são HIF-1 α e HIF-2 α , que formam o complexo sensível a disponibilidade de oxigênio, e HIF-1 β , que é constitutivamente expresso nas células (Rey et al., 2017; Wong et al., 2017).

HIF-1 α é expresso em praticamente em todas as células e tecidos dos mamíferos, quando em hipóxia, e está envolvido principalmente na iniciação e promoção da angiogênese. Isto ocorre devido ao aumento na expressão de diversos fatores pró-angiogênicos como VEGF e à maior produção das enzimas heme-oxigenase (HO1) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), principalmente nas células endoteliais (Jain et al., 2018; Duran et al., 2017).

O aumento na expressão/atividade de HIF-1 α , observado no presente trabalho, pode estar relacionado com a maior concentração de TNF- α como explicado anteriormente. Além disso, já foi observado aumento nas concentrações/atividade de HIF pelo nitrolinoleato, um

metabólito do linoleico. O nitrolinoleato é originado pela reação do ácido linoleico com o óxido nítrico, encontrado principalmente nos vasos após eventos de isquemia e reperfusão (Rudnicki et al., 2011).

A maior expressão de genes-alvo de HIF após o tratamento *in vitro* com LA, reforça que esta via pode ser a responsável pelos efeitos observados na angiogênese.

Estudos são controversos sobre a ação de TGF- β s. Alguns trabalhos apontam que TGF- β inibe a migração e proliferação celular (Frater-Schroder et al., 1986), enquanto outros apontam que essa proteína promove a proliferação celular (Li et al., 2001) e e aumentam a angiogênese e maturação de vasos (em pequenas doses), porém em altas níveis inibem células endoteliais e maturação de vasos (Hofer & Schweighofer, 2007).

O aumento na expressão de GLUT-1 e PFKB3 indica possível adaptação metabólica frente a baixa disponibilidade de glicose. GLUT-1 é um transportador de glicose expresso principalmente em células endoteliais cerebrais (Okamoto et al., 1998) Assim, ele é fundamental para a manutenção das funções cerebrais, uma vez que o cérebro utiliza a glicose para produção energética (Okamoto et al., 1998). Já a PFKB3 é uma enzima, reguladora da via glicolítica, envolvida também na proliferação celular. Estudos indicam que a PFKB3 inibe a apoptose e promove a progressão das células na fase G1/S do ciclo celular (Yalcin et al., 2009; Minchenko et al., 2014; Yalcin et al., 2014). Além disso, PFKB3 também parece estar envolvida na diferenciação das células endoteliais em *tip cells* (Xu et al., 2014).

Considerando os resultados apresentados no presente trabalho, podemos concluir que a administração oral de linoleico, para camundongos durante a cicatrização de feridas, aumentou a vascularização do tecido. Este efeito parece ser decorrente da indução de proliferação das células endoteliais, bem como do aumento na atividade de HIF 1 α . Este último induzindo maior produção e fatores pró-angiogênicos como o VEGF.

7. CONCLUSÃO

No presente trabalho demonstramos que a administração oral com ácido linoleico aumentou a vascularização do tecido cicatricial. Este efeito parece estar associado com uma ação pró-angiogênica deste ácido graxo nas funções de células endoteliais, uma vez que ele aumentou a proliferação destas células e elevou as concentrações de fatores pró-angiogênicos.

8. REFERÊNCIAS

- Aiello LP, Wong JS. (2000). Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int Suppl.* 77: S113–9.
- Aird WC. Endothelium as an organ system. *Crit Care Med* 32: S271–S279, 2004.
- Bao P, Arber KBA, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich P, Brem H. (2009). The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research.* 153, 347–358.
- Basak S, Mrinal K. Das A, Asim K, Duttaroy. (2013). Fatty acid-induced angiogenesis in first trimester placental trophoblast cells: Possible roles of cellular fatty acid-binding proteins. *Life Sciences.* 93:755–762
- Belal SA, Sivakumara AS, Kanga DR, Choc S, Choea HS, Shima KS. (2018). Modulatory effect of linoleic and oleic acid on cell proliferation and lipid metabolism gene expressions in primary bovine satellite cells. *Animal Cells and Systems.* vol 22, n.5, 324–333
- Bergmann J, Meuller M, Baumann N, Reichert M, Heneweer C, Bolik J, Leucke K, Gruber S, Carambia A, Boretius S, Leuschner I, Becker T, Rabe B, Herkel J, Wunderlich T, Mitreucker WI, Rose-John W, Schmidt-Arras W. (2017). IL-6 Trans-Signaling Is Essential for the Development of Hepatocellular Carcinoma in Mice. *Hepatology*, vol. 65, n. 1.
- Betz C, Lenard A, Belting, HG, Affolter M. (2016). Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Development.* 143, 2249–2260.
- Bikfalvi A. (2017). History and conceptual developments in vascular biology and angiogenesis research: a personal view. *Angiogenesis.* 20:463–78.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry;* 72: 248-54.
- Broughton G, Janis JE, Attinger CE. (2006). The basic science of wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 117(7 Suppl):12S-34S.
- Calder PC. (2011). Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *European journal of pharmacology.* 668 Suppl 1: p. S50-8.

Calder PC. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 39(1 Suppl):18S-32S.

Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine.* 6(4): p. 38-95.

Cash JL, Martin P. (2016). Myeloid Cells in Cutaneous Wound Repair. *Microbiol Spectr.* 4(3).

Chen SF, Fei X, Li SH. (1995). A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries, *Microvasc. Res.* 50; 119–128.

De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong Brian W, Cantelmo Anna R, Quaegebeur A, et al. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 154: 651–663,2013.

Duran CL, Howell DW, Dave JM, Smith RL, Torrie ME, Essner JJ, Bayless KJ. (2017). Molecular Regulation of Sprouting Angiogenesis. *Compr Physiol.* 8:153–235.

Eming SA, Krieg T, Davidson JM. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*; 127:514-25.

Fraisl P. (2013). Crosstalk between oxygen- and nitric oxide-dependent signaling pathways in angiogenesis. *Exp. Cell Res.*, 319, pp. 1331-1339.

Frank S, et al., (2002). Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. *Kidney international.* 61(3): p. 882-8.

Frater-Schroder M, Muller G, Birchmeier W, Bohlen P. (1986) Transforming growth factor-beta inhibits endothelial cell proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1986;137(1):295–302.

Fritsche KL. (2008). Too much linoleic acid promotes inflammation-doesn't it? Prostaglandins Leukot. *Essent. Fatty Acids.* 79, 173–175.

Frykberg RG, Banks J. (2015). Challenges in the treatment of chronic wounds. *Adv Wound Care.* 4, 560–582.

Gao Y, Zhou S, Xu Y, Sheng S, Qian SY, Huo H. (2019). Nitric oxide synthase inhibitors 1400W and L-NIO inhibit angiogenesis pathway of colorectal cancer. *Nitric Oxide.* Volume 83, pages 33-39.

- Gealekman O, et al. (2008). Enhanced angiogenesis in obesity and in response to PPAR γ activators through adipocyte VEGF and ANGPTL4 production. *American journal of physiology endocrinology and metabolism*. 295(5): p. E1056-64.
- Gorjão R, Azevedo-Martins AK, Rodrigues HG, Abdulkader F, Arcisio-Miranda M, Procopio J, Curi R. (2009). Comparative effects of DHA and EPA on cell function. *Pharmacol Ther*. 122(1):56-64.
- Hatanaka E, Levada-Pires AC, Pithon-Curi TC, Curi R. (2006). Systematic study on ROS production induced by oleic, linoleic, and gamma-linolenic acids in human and rat neutrophils. *Free Radic Biol Med*. 41(7):1124-32.
- Hertig A. (1935). Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the Macaque monkey. *Contributions To Embryology*. vol. 25, p. 37.
- Hofer E, Schweighofer B. (2007). Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis. *Thrombosis and Haemostasis*. 97(3):355–63.
- Hong, W. X., Hu, M. S., Esquivel, M., Liang, G. Y., Rennert, R. C., McArdle, A., Longaker, M. T. (2014). The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 3(5), 390–399.
- Jain T, Nikolopoulou EA, Xu Q, Qu A. (2016). Wound Healing: Part I. Basic Science. *Plast. Reconstr. Surg*. Sep;138(3 Suppl):9S-17S.
- Jain T, Nikolopoulou EA, Xu Q, Qu A. (2018). Hypoxia inducible factor as a therapeutic target for atherosclerosis. *Pharmacol Ther*. 2018 Mar;183:22-33.
- Jin F, Zheng X, Yang Y, Yao G, Ye L, Doeppner TR, Hermann DM, Wang H, Dai Y. (2019). Impairment of hypoxia-induced angiogenesis by LDL involves a HIF-centered signaling network linking inflammatory TNF α and angiogenic VEGF. *Aging (Albany NY)*. 18;11(2):328-349.
- Kang JX, Weylandt KH. (2008). Modulation of inflammatory cytokines by omega-3 fatty acids. *Subcell Biochem*. 49:133–43.
- Kaur N, Chugh V, Gupta AK. (2014). Essential fatty acids as functional components of foods—a review. *Journal of food science and technology*. 51(10): p. 2289-303.

- Kruzliak P, Kovacova G, Pechanova O. (2013). Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of angiogenesis-inhibitor-induced hypertension. *Angiogenesis*, pp. 289-295.
- Li C, Guo B, Bernabeu C, Kumar S. (2001). Angiogenesis in breast cancer: the role of transforming growth factor beta and CD105. *Microscopy Research and Technique*. 52(4):437–49.
- Li Q, Yu Y, Bischoff J, Mulliken JB, Olsen BR. (2003). Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. *J Pathol*. 201: 296-302.
- Loiola RA, Torres TC, Aburaya CM, Landgraf MA, Landgraf RG, Bosco Pesquero J, Fernandes L. (2013). Generation and characterization of a spontaneously immortalized endothelial cell line from mice microcirculation. *Exp Cell Res*. 319(8):1102-10.
- Makanya AN, Hlushchuk, R, Djonov VG. (2009). Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis*. 12, 113–123.
- Martins de Lima T, Gorjão R, Hatanaka E, Cury-Boaventura MF, Portioli Silva EP, Procopio J, Curi R (2007) Mechanisms by which fatty acids regulate leucocyte function. *Clin Sci*. 113(2):65-77.
- Minchenko OH, Tsuchihara K, Minchenko DO, Bikfalvi A, Esumi H. (2014). Mechanisms of regulation of PFKFB expression in pancreatic and gastric cancer cells. *World journal of gastroenterology: WJG*. 20(38):13705–13717.
- Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. (2003). Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr. Pharmaceut*. pp. 521-530.
- Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. (2004). Role of nitric oxide in tumor angiogenesis. *Cancer Treat Res.*, 117, pp. 155-167.
- Nakamura Y, Kozuka M, Naniwa K, Takabayasho S, Torikai K, Hayas R, Sato T, Ohigashi H, Osawa T. (2003). Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. *Free Radic Biol Med*, 35. pp. 997-1007.

Nasdala I, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Kuhn A, Ebnet K, Brachtendorf G, Samulowitz U, Kuster B, Engelhardt B, Vestweber D, Butz S (2002) A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *J Biol Chem.* 277:16294–16303.

Okamoto MM, Casella EB, Alves RC, Paz JÁ, Marques-Dias MJ, Machado UF. (1998). De Vivo's syndrome: reduction in glucose transporter GLUT 1 content. Abstracts of IV *European Congress of Endocrinology*, p2-69.

Patel J, Landers K, Mortimer RH, Richard K (2010) Regulation of hypoxia inducible factors (HIF) in hypoxia and normoxia during placental development. *Placenta.* 31:951–7.

Phng L-K, Gerhardt H (2009) Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell* 16:196–208.

Rey S, Schito L, Wouters BG, Eliasof S, Kerbel RS. (2017). Targeting Hypoxia-Inducible Factors for Antiangiogenic. *Cancer Therapy. Trends Cancer.* 3:529–41.

Roberts DD, Isenberg JS, Ridnour LA, Wink DA. 2007. Nitric oxide and its gatekeeper thrombospondin-1 in tumor angiogenesis. *Clin. Canc. Res.*, 13, pp. 795-798

Rodrigues HG, et al. (2012). Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing. *The Journal of investigative dermatology.* 132(1): p. 208-15.

Rodrigues HG, Vinolo MAR, Sato FT, et al. (2016). Oral Administration of Linoleic Acid Induces New Vessel Formation and Improves Skin Wound Healing in Diabetic Rats. Ljubimov AV, ed. *PLoS ONE.* 11(10): e0165115.

Rojo L, Villano CM, Joseph G, Schmidt B, Shulaev B, Shuman BL, Lila MA, Raskin I. (2010). Wound-healing properties of nut oil from *Pouteria lucuma*. *J Cosmet Dermatol.* September; 9(3): 185–195.

Rosen BP. (2002). Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* 529:86-92.

Rudnicki M, Luciane A. Faine, Nathalie Dehne, Dmitry Namgaladze, Simone Ferderbar, Ricardo Weinlich, Gustavo P. Amarante-Mendes, Chao Y.I. Yan, Jose´ E. Krieger, Bernhard Bru´ne, Dulcinea S.P. Abdalla. (2011). Hypoxia Inducible Factor–Dependent Regulation of Angiogenesis by Nitro–Fatty Acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31:00-00

- Scheller JÉu, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 1813:878-888.
- Schofield J, Ratcliffe P, J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* volume 5, pages 343–354.
- Semenza GL. (2011). Hypoxia. Cross talk between oxygen sensing and the cell cycle machinery. *Am J Physiol Cell Physiol*; 301:C550.
- Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, et al. (1996). Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol*. 149:293.
- Sessa WC. (2009). Molecular control of blood flow and angiogenesis: role of nitric oxide. *J. Thromb. Haemostasis*, 7 (Suppl 1), pp. 35-37
- Shaw TJ, Martin P. (2009). Wound repair at a glance. *J Cell Sci*. 122:3209-13.
- Silva, JR, Burger, B, Kühl, C, Candreva, T, Dos Anjos, M, & Rodrigues, HG. (2018). Wound Healing and Omega-6 Fatty Acids: From Inflammation to Repair. *Mediators of inflammation*, 2018, 2503950.
- Singh RP, Agarwal R. (2007). Inducible nitric oxide synthase-vascular endothelial growth factor axis: a potential target to inhibit tumor angiogenesis by dietary agents. *Curr. Cancer Drug Targets*. 7 pp. 475-483
- Spencer L, Mann C, Metcalfe M, Webb M, Pollard C, Spencer D, et al. (2009). The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. *Eur J Cancer*. 45: 2077–86.
- Szymcsak M, Murray M, Petrovic N. (2008). Modulation of angiogenesis by ômega 3 polynnsaturated fatty acids is mediated by cyclooxygenase”. *Blood* 111 (7): 3514-21.
- Van der Zee R, Murohara T, Luo Z, et al. (1997). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation*. 95:1030.

- Viallard C, Larrive B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 20:409–426.
- Wang H, Keiser JA. (1998). Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: Role of flt-1. *Circ Res*. 83:832.
- Watanabe Y, Lee SW, Detmar M, et al. (1997). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) delays and induces escape from senescence in human dermal microvascular endothelial cells. *Oncogene*. 14:2025.
- Wong BW, Marsch E, Treps L, Baes M, Carmeliet P. (2017). Endothelial cell metabolism in health and disease: impact of hypoxia. *EMBO J*. 36:2187–203.
- Worley CA. (2006). So, what do I put on this wound? Making sense of the wound dressing puzzle: Part I. *Medsurg Nurs*. 15(2): 106-7.
- Xu Y, An X, Guo X, Habtetsion, TG, Wang Y, Xu X, Kandala S, Li Q, Li H, Zhang C, Caldwell RB, Fulton DJ, Su Y, Hoda MN, Zhou G, Wu C, Huo Y. (2014). Endothelial PFKFB3 plays a critical role in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jun;34(6):1231-9.
- Xue M, Jackson CJ. (2015). Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. Mar 1;4(3):119-136.
- Yalcin A, Brian F, Clem, Alan Simmons, Andrew Lane, Kristin Nelson, Amy L. Clem, Erin Brock, Deanna Siow, Binks Wattenberg, Sucheta Telang, and Jason Chesney. (2009). Nuclear Targeting of 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) Increases Proliferation via Cyclin-dependent Kinases. *The journal of biological chemistry*. Vol. 284, no. 36, pp. 24223–24232.
- Yalcin A, Clem BF, Imbert-Fernandez Y, Ozcan SC, Peker S, O’Neal S, Klarer AC, Clem AC, Telang S, Chesney J. (2014). 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death Dis*. 2014 Jul 17;5:e1337.
- Ziche M, Morbidelli L. (2009). Molecular regulation of tumour angiogenesis by nitric oxide. *Eur. Cytokine Netw.*, 20, pp. 164-170.