

Hosana Gomes Rodrigues

Modulação do processo de cicatrização pelos ácidos oleico e linoleico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

Versão Original

São Paulo

2011

RESUMO

RODRIGUES, HG. **Modulação do processo de cicatrização pelos ácidos oleico e linoleico**. 2001 91 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

No Brasil, misturas de ácidos graxos (AGs) contendo os ácidos oleico (OL - monoinsaturado) e linoleico (Li - poliinsaturado) são utilizadas topicamente no tratamento das úlceras de pressão. Entretanto, o mecanismo de ação desses na cicatrização é pouco conhecido. O presente estudo teve como objetivo caracterizar o processo de cicatrização e investigar os efeitos da suplementação nutricional (gavagem) com OL e Li em estudos *in vivo* e *ex vivo*. Após anestesia, uma área de 10 mm² de pele foi removida cirurgicamente da região dorsal dos animais. A suplementação com OL e Li não alterou os parâmetros nutricionais. As atividades séricas das enzimas marcadoras de danos hepáticos (AST, ALT e LDH) e a análise histológica do intestino delgado não evidenciaram qualquer efeito tóxico do procedimento experimental. A suplementação com Li reduziu o tamanho das feridas no sétimo dia após a indução. Esse resultado foi acompanhado de aumento na produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Apesar de não ter elevado a produção de H₂O₂ na primeira hora, o OL reduziu o conteúdo deste após 24 horas. A administração de Li acelerou a resposta migratória, aparecendo células inflamatórias uma hora após o ferimento. A ingestão de OL induziu ativação do fator de transcrição NF-κB e o Li ativou AP-1 após uma hora. Em 24 horas, ambos AGs reduziram a ativação do NF-κB e não alteraram o estado de ativação do AP-1. Li elevou as concentrações de CINC-2αβ e OL aumentou TNF-α, no homogenato, uma hora após a indução da ferida. Em 24 horas, ambos AGs reduziram a expressão e as concentrações de IL-1β, IL-6 e MIP-3α. Não foram observadas modificações nas concentrações de VEGF nos grupos estudados. A suplementação com OL e Li acelerou a fase inflamatória do processo de cicatrização. Os efeitos da suplementação com OL e Li sobre funções de neutrófilos foram então estudados. A resposta migratória dos neutrófilos foi aumentada após a ingestão de OL e Li. O mesmo ocorreu com a expressão de L-selectina. Observamos também aumento no rolamento e na aderência dos leucócitos aos vasos. A produção

de citocinas pró-inflamatórias (CINC-2 $\alpha\beta$ e IL-1 β) foi modificada pela ingestão de OL e Li; aumento em 4 horas (Li) e redução (OL e Li) em 18 horas de incubação. Desta forma, a suplementação com OL e Li acelera o processo de cicatrização e os neutrófilos estão envolvidos

Palavras-chave: Ácidos graxos. Cicatrização. Suplementação. Citocinas. Inflamação.

ABSTRACT

RODRIGUES, HG. **Modulation of the wound healing by oleic and linoleic acids supplementation.** 2011 91 f. Ph.D. Thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

In Brazil, fatty acids (FA) mixtures containing oleic (OL - monounsaturated) and linoleic (Li - polyunsaturated) have been topically used in the treatment of pressure ulcers. However, the mechanism involved in the healing process is unknown. This study aimed to characterize the healing process and to investigate the effects of nutritional supplementation (gavage) with OL and Li on the healing process through *in vivo* and *in vitro* experiments. After anesthesia, an area of 10 mm² of skin was surgically removed from the dorsum. Supplementation with OL or Li did not alter the nutritional parameters. Serum activities of marker enzymes of liver damage (AST, ALT and LDH) and histology of the small intestine of the rats supplemented with the fatty acids did not show any toxicity sign. Li supplementation reduced the size of the wounds on the seventh day after induction. This result was accompanied by increased production of hydrogen peroxide (H₂O₂) in the Li group. OL reduced the H₂O₂ content after 24 hours and had no effect after one hour. Li administration accelerated the migratory response, since inflammatory cells were found one hour after the wound. The intake of OL activated the transcription factor NF-κB and Li increased the activation of AP-1 one hour after induction of the wound. Both fatty acids reduced the activation of NF-κB and did not alter the state of activation of AP-1 after 24 hours. Li raised the concentrations of CINC-2αβ and OL increased TNF-α, in the homogenate, one hour after wound induction. In 24 hours, the FA reduced expression and concentrations of IL-1β, IL-6 and MIP-3α. There were no changes in the concentrations of VEGF in any group. Putting together, our results demonstrate that OL and Li accelerate the inflammatory phase of the wound healing. The effects of supplementation with OL and Li on neutrophil functions were then investigated. The migratory response of neutrophils was increased after ingestion of OL and Li. The same occurred with the expression of L-selectin. We also observed an increase in rolling and adherence of leukocytes to vessels. The production of pro-inflammatory

cytokines (CINC-and IL-1 β 2 $\alpha\beta$) was modified by OL and Li; increase in 4 hours (Li) and reduction (OL e Li) in 18 hours of incubation. Thus, the supplementation with OL or Li accelerates the healing process and neutrophils were involved.

Key words: Fatty acids. Wound healing. Supplementation. Cytokines. Inflammation.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 O processo de cicatrização de feridas

O processo de cicatrização de feridas envolve uma cascata ordenada de eventos: inflamação, angiogênese, deposição de colágeno, reepitelização e formação de tecido de remodelamento (MARTIN, 1997). O objetivo destes eventos reparadores é impedir a invasão de patógenos e restabelecer a integridade dos tecidos danificados, reconstruindo assim a funcionalidade da pele (SINGER e CLARK, 1999). Este processo envolve grande variedade de células (neutrófilos, macrófagos, fibroblastos), fatores locais e sistêmicos como espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (FC).

A fase inflamatória caracteriza-se pelo aparecimento de dor, calor, rubor e edema. A injúria geralmente causa ruptura nos vasos sanguíneos, com extravasamento dos constituintes do sangue para a região lesada. O dano endotelial resulta na ativação de plaquetas e da cascata de coagulação, que leva à formação de uma camada de fibrina (MOORE, 1999). Em seguida, é formada uma matriz provisória para a migração celular.

A importância das EROs no processo de cicatrização foi verificada em estudos que utilizaram animais com mutações na estrutura da NADPH oxidase, principal responsável pela produção de EROs (JACKSON et al., 1995). No leito da ferida, as principais fontes de EROs são as células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos) e as células não fagocíticas como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais (ROY et al., 2006) Em baixas concentrações, as EROs impedem a invasão de microrganismos e atuam como mensageiros celulares, interligando mecanismos de sinalização como a ativação de fatores de transcrição e a produção de citocinas pró-inflamatórias (RHEE, 1999). Em 2006, (ROY et al., 2006) estimaram as concentrações de EROs (aproximadamente 200 μM) em feridas. Neste estudo foi observado que o local da ferida é rico em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e que a expressão do fator de crescimento vascular-endotelial (VEGF)

e de seu receptor VEGFR-2 é modulada por esta ERO. Os autores observaram também aumento da vascularização e no número de células endoteliais em feridas tratadas com H₂O₂ (ROY et al., 2006).

O aumento na permeabilidade vascular é outro fator importante relacionado ao fechamento da ferida. A permeabilidade elevada dos vasos permite a deposição de matriz rica em fibrina, a que é fundamental para a migração celular (BROWN et al., 1988). A resposta migratória é um processo altamente regulado e envolve diversos mecanismos como a presença ou ausência de quimioatraentes específicos, a habilidade da célula em migrar ao longo de um gradiente quimiotático, a interação entre receptor-ligante e a expressão de moléculas de adesão na superfície das células inflamatórias e nos vasos sanguíneos (ROLLINS et al., 1991). Além desses fatores, a fluidez da membrana celular também modula a resposta quimiotática (WOLACH et al., 1992).

Uma vez no local da ferida, células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos ativados desencadeiam a liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, EROs e enzimas proteolíticas. A produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) ocorre rapidamente após o trauma. TNF- α e IL-1 são importantes na ativação de células endoteliais e na expressão de moléculas de adesão, fato que contribui para o recrutamento e acúmulo de mais fagócitos na área inflamada (MOLLINEDO et al., 1999). As moléculas de adesão são importantes na integração celular, pois promovem interações célula-célula e célula-matriz (TSIROGIANNI et al., 2006). As quimiocinas, por sua vez, contribuem para a regulação da epitelização, angiogênese e remodelamento do tecido (GILLITZER e GOEBELER, 2001). As proteínas inflamatórias para macrófagos (MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2), proteína quimioatraente de macrófagos-1 (MCP-1) e a interleucina 8 (IL-8) são exemplos de quimiocinas (GILLITZER e GOEBELER, 2001; EFRON e MOLDAWER, 2004). As MIPs integram os eventos inflamatórios com os de reparo tecidual.

A produção de mediadores inflamatórios é finamente regulada. Um dos pontos de regulação é ativação/inibição de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF- κ B). O NF- κ B é formado por subunidades citoplasmáticas que se encontram na forma inativa. Quando ativado, O NF- κ B transloca para o núcleo e liga-se a região consenso de genes que expressam citocinas e enzimas oxidantes. A indução desta cascata de sinalização é necessária para que a resposta imune ocorra, entretanto, ela deve ser eficientemente desligada para evitar danos teciduais. O descontrole na resposta inflamatória está relacionado com a incidência de câncer e doenças autoimunes (KARIN, 2005). Outro importante fator de transcrição envolvido no reparo tecidual é a proteína ativadora-1 (AP-1). O AP-1 é constituído por diversas subunidades das famílias Jun e Fos (SHAULIAN e KARIN, 2001) e sua ativação e expressão é influenciada por interleucinas e o fator de crescimento transformante β (TGF- β) (ANGEL et al., 2001). Animais knockout para uma ou mais subunidades do AP-1 apresentam cicatrização deficiente devido a alterações na fase de reepitelização (LI et al., 2003) e ao prolongamento da fase inflamatória (FLORIN et al., 2006).

Na fase proliferativa do processo de cicatrização ocorre neoangiogênese, produção de colágeno jovem pelos fibroblastos e intensa migração celular, principalmente de queratinócitos, promovendo a reepitelização. Inicialmente, os macrófagos ativados liberam PDGF, TGF- β 1 e fator de crescimento de fibroblastos (FGF), que estimulam a proliferação e a migração desses para a área lesada (GREILING e CLARK, 1997) e a síntese de glicosaminoglicanas, proteoglicanas e colágeno da nova matriz extracelular. Com o aumento do número de fibroblastos ativados, a matriz extracelular é substituída por tecido conjuntivo mais forte e elástico. Ao final da etapa proliferativa, o leito da ferida está totalmente preenchido por tecido de granulação.

A fase de remodelamento envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno, aumentando a sua resistência pelo fato de que a organização das fibras acompanha as forças mecânicas a que o tecido está sujeito durante a atividade normal. Ao final desta etapa, os anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas sofrem regeneração

limitada e a coloração da cicatriz permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes são hipovascularizadas devido ao desaparecimento dos neocapilares.

Apesar da importância do tratamento de feridas pouco avanço foi alcançado nos últimos anos. O uso de curativos em pacientes com feridas de difícil cicatrização tem como principal função a redução na perda de água e a contaminação por microrganismos. Atualmente, esses curativos são impregnados com sulfato de prata, fatores de crescimento ou ácidos graxos (BEAM, 2009; BERLANGA-ACOSTA et al., 2009).

1.2 Os ácidos graxos no tratamento de feridas

Os ácidos graxos (AG) são formados por uma cadeia hidrocarbonada e um grupamento carboxila terminal. Podem variar quanto ao número de carbonos na cadeia e a presença de duplas ligações. Os SFAs (ácidos graxos saturados) não apresentam dupla ligação; já os MUFAs (ácidos graxos monoinsaturados) possuem uma insaturação e os PUFAs (ácidos graxos poliinsaturados) apresentam duas ou mais insaturações. Com base no número e na posição das duplas ligações, os ácidos graxos de cadeia longa são classificados em três grandes famílias: ω -3, ω -6 e ω -9.

Os AG da família ω -6 (linoleico) e ω -3 (α -linolênico) são classificados como AG essenciais, por não serem sintetizados pelo organismo humano, devendo, portanto, ser consumidos através da dieta. Entretanto, eles podem ser alongados e dessaturados. A metabolização do ácido linoleico (Li) resulta na formação do ácido araquidônico, enquanto que EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosaexaenóico) são os produtos finais da metabolização do ácido α -linolênico (CALDER et al., 2009). Quantidades excessivas de ω -6 e o conseqüente aumento na relação ω -6/ ω -3 estão envolvidos na patogênese de diversas doenças autoimunes e inflamatórias, cardiovasculares e câncer (SIMOPOULOS, 2008). Essa associação é devida ao desequilíbrio entre a produção de mediadores pró e antiinflamatórios (SIMOPOULOS, 2008).

Nos países Ocidentais, a ingestão per capita diária de lipídios é de 35-40% do consumo energético total (RISERUS, 2008). Entretanto, este valor pode variar entre menos de 20 g/dia (nos países em desenvolvimento) a mais de 100 g/dia (nos países desenvolvidos). Além da quantidade, a composição dos ácidos graxos nos alimentos sofre grande variação nos diferentes países e tem mudado ao longo dos anos (CALDER et al., 2009) devido a diferenças na preparação dos alimentos.

Em 1970 foram publicados os primeiros estudos com ácidos graxos e as células do sistema imune (PIETTE e SAUGIER, 1970). Desde então, é cada vez mais evidente o papel modulador desses lipídios sobre diversas funções celulares. Os AG podem interferir com o metabolismo e as funções celulares direta ou indiretamente: incorporação nas membranas celulares, participação na sinalização intracelular, ativação/inibição de fatores de transcrição e conseqüente modulação da expressão de genes. Além disso, alguns são precursores da síntese de eicosanóides (como o ácido araquidônico e o EPA), (MARTINS DE LIMA et al., 2007).

Os ácidos graxos consumidos podem ser incorporados às membranas celulares na forma de fosfolipídios, ácidos graxos livres ou ésteres de colesterol (CURI et al., 2002). Na forma esterificados, são hidrolisados pelas enzimas fosfolipases A₂ ou C ou pela ativação da proteína quinase C (PKC). Sabe-se que o conteúdo e a composição de fosfolipídios nos leucócitos são afetados pela disponibilidade dos ácidos graxos e do colesterol na dieta. Yaqoob (1998) demonstrou que aumentando o consumo de ácido oleico há maior incorporação deste ácido graxo nos fosfolipídios de células mononucleares isoladas do sangue. Os produtos gerados pela decomposição dos fosfolipídios atuam como segundo mensageiros influenciando cascatas de sinalização como a do NF-κB.

Na década de 80, Angel Keys iniciou os estudos sobre a dieta do Mediterrâneo (KEYS et al., 1986). A dieta dos povos do Mediterrâneo é rica em ácidos graxos monoinsaturados (principalmente o ácido oleico) e está associada à redução no risco de doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade (GIUGLIANO e ESPOSITO, 2008). Contudo, muita controvérsia

ainda existe sobre os nutrientes responsáveis pelos efeitos observados. Os principais candidatos são o ácido oleico e os agentes antioxidantes presentes no óleo de oliva extra-virgem (DE LORGERIL et al., 1999).

O ácido oleico (OL) não é essencial, uma vez que pode ser sintetizado *de novo* pelo organismo. A ingestão de OL é elevada em diversas populações, sendo o segundo ácido graxo mais consumido no mundo (US DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2008). O efeito do OL sobre as funções imunes é controverso. Alguns grupos têm demonstrado que o OL não apresenta ação imunomoduladora (YAQOOB et al., 1998; GRANATO et al., 2000) enquanto outros têm encontrado uma resposta supressora (TSANG et al., 1977; MOUSSA et al., 2000).

Embora a literatura sobre o uso de ácidos graxos no tratamento de feridas seja escassa, esta é uma prática comum em países em desenvolvimento, como o Brasil (PIEPER e CALIRI, 2003). O tratamento tópico com ácidos graxos está relacionado com a maior hidratação e elasticidade da pele, o que impede a entrada de microrganismos e a perda de água para o meio externo (DECLAIR, 1997). Contudo, os eventos moleculares e celulares envolvidos nesse processo não são conhecidos.

2 CONCLUSÕES

O processo de cicatrização foi acelerado pela ingestão de ácido graxo linoleico. Com base nos resultados apresentados sugerimos que o consumo de Li melhora o reparo tecidual por abreviar a fase inflamatória e assim empreender a fase de formação de tecido de granulação. A ingestão de OL, por sua vez, também modulou a fase inflamatória, entretanto, as alterações observadas não foram suficientes para antecipar a próxima fase do processo de reparo tecidual. Acreditamos que os efeitos dos ácidos graxos sobre a ferida foram devidos, em grande parte, a alterações nas funções dos neutrófilos. A ingestão tanto de OL como Li elevou a resposta migratória, a expressão de moléculas de adesão, a interação leucócito-endotélio e a produção de citocinas nos neutrófilos.

3 REFERÊNCIAS

AMACHER, D. E. Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 27, n. 2, p. 119-130, 1998.

ANGEL, P. et al. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. **Oncogene**, v. 20, n. 19, p. 2413-2423, 2001.

ARENZANA-SEISDEDOS, F. et al. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, n. 5, p. 2689-2696, 1995.

BAER, D. J. et al. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, n. 6, p. 969-973, 2004.

BALDWIN, A. S. Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 14, p. 649-683, 1996.

BARSANTE, M. M. et al. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 153, n. 5, p. 992-1002, 2008.

BEAM, J. W. Topical silver for infected wounds. **J. Athl. Train.**, v. 44, n. 5, p. 531-533, 2009.

BERLANGA-ACOSTA, J. et al. Epidermal growth factor in clinical practice - a review of its biological actions, clinical indications and safety implications. **Int. Wound. J.**, v. 6, n. 5, p. 331-346, 2009.

BIZZARRI, C. et al. ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. **Pharmacol. Ther.**, v. 112, n. 1, p. 139-149, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWN, L. F. et al. Fibrinogen influx and accumulation of cross-linked fibrin in healing wounds and in tumor stroma. **Am. J. Pathol.**, v. 130, n. 3, p. 455-465, 1988.

BROWN L. F. et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. **J. Exp. Med.**, v. 176, n. 5, p. 1375-1379, 1992.

CALDER, P. C. et al. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. **Br. J. Nutr.**, v.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023:
informação e documentação: referências: elaboração. Rio
de Janeiro. 2002.

101, p. S1-45, 2009. Suppl 1

CARDOSO, C. R. et al. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound. Repair. Regen.**, v. 12, n. 2, p. 235-243, 2004.

CARVETH, H. J. et al. Neutrophil activating factor (NAF) induces polymorphonuclear leukocyte adherence to endothelial cells and to subendothelial matrix proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 162, n. 1, p. 387-393, 1989.

CASSATELLA, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunol. Today.**, v. 16, n. 1, p. 21-26, 1995.

CHESNUTT, B. C. et al. Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin. **Microcirculation**, v. 13, n. 2, p. 99-109, 2006.

CHO, M. H. et al. A bioluminescent cytotoxicity assay for assessment of membrane integrity using a proteolytic biomarker. **Toxicol. In Vitro**, v. 22, n. 4, p. 1099-1106, 2008.

CURI R. et al. **Entendendo a gordura**. São Paulo: Manole, 2002.

CURY-BOAVENTURA, M. F. et al. Comparative toxicity of oleic and linoleic acid on human lymphocytes. **Life Sci.**, v. 78, n. 13, p. 1448-1456, 2006.

CURY-BOAVENTURA, M. F. et al. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Raji cells. **Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 395-405, 2005.

DAHLEN, S. E. et al. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 78, n. 6, p. 3887-3891, 1981.

DE LORGERIL, M. et al. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. **Circulation**, v. 99, n. 6, p. 779-785, 1999.

DECLAIR, V. The usefulness of topical application of essential fatty acids (EFA) to prevent pressure ulcers. **Ostomy Wound Manage**, v. 43, n. 5, p. 48-52, 54, 1997.

DETMERS, P. A. et al. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. **J. Exp. Med.**, v. 171, n. 4, p. 1155-1162, 1990.

EDWARDS, J. C. et al. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. **J. Pathol.**, v. 134, n. 2, p. 147-156, 1981.

EFRON, P. A.; MOLDAWER, L. L. Cytokines and wound healing: the role of cytokine and anticytokine therapy in the repair response. **J. Burn. Care. Rehabil.**, v. 25, n. 2, p. 149-160, 2004.

FAINE, L. A. et al. Effects of olive oil and its minor constituents on serum lipids, oxidative stress, and energy metabolism in cardiac muscle. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 84, n. 2, p. 239-245, 2006.

FARSKY, S. H. et al. Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effect on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. **Inflamm. Res.**, v. 53, n. 9, p. 442-452, 2004.

FLORIN, L. et al. Delayed wound healing and epidermal hyperproliferation in mice lacking JunB in the skin. **J. Invest. Dermatol.**, v. 126, n. 4, p. 902-911, 2006.

FOUNDATION, B. N. **Unsaturated fatty acids:** nutrition and physiological significance. London: Chapman and Hall, 1992

FUJIYAMA, Y. et al. Butter feeding enhances TNF-alpha production from macrophages and lymphocyte adherence in murine small intestinal microvessels. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 22, n. 11, p. 1838-1845, 2007.

GERARD, C.; ROLLINS, B. J. Chemokines and disease. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 2, p. 108-115, 2001.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **J. Leukoc. Biol.**, v. 69, n. 4, p. 513-521, 2001.

GIUGLIANO, D.; ESPOSITO, K. Mediterranean diet and metabolic diseases. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 19, n. 1, p. 63-68, 2008.

GLOGAUER, M. et al. Two pathways through Cdc42 couple the N-formyl receptor to actin nucleation in permeabilized human neutrophils. **J. Cell. Biol.**, v. 150, n. 4, p. 785-796, 2000.

GRANATO, D. et al. Effects of parenteral lipid emulsions with different fatty acid composition on immune cell functions in vitro. **J. Parenter. Enteral. Nutr.**, v. 24, n. 2, p. 113-118, 2000.

GREILING, D.; CLARK, R. A. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. **J. Cell. Sci.**, v. 110 (Pt 7), p. 861-870, 1997.

GRELLNER, W. et al. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds. **Forensic. Sci. Int.**, v. 113, n. 1-3, p. 251-264, 2000.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-321, 2008.

HAUSER, C. et al. Interleukin 1 is present in normal human epidermis. **J. Immunol.**, v. 136, n. 9, p. 3317-3323, 1986.

HIGUCHI, R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology (N Y)**, v. 10, n. 4, p. 413-417, 1992.

HUBNER, G. et al. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. **Cytokine**, v. 8, n. 7, p. 548-556, 1996.

HUO, Y. et al. Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. **Circ. Res.**, v. 87, n. 2, p. 153-159, 2000.

JACKSON, S. H. et al. The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. **J. Exp. Med.**, v. 182, n. 3, p. 751-758, 1995.

JANETOPOULOS, C.; FIRTEL, R. A. Directional sensing during chemotaxis. **FEBS. Lett.**, v. 582, n. 14, p. 2075-2085, 2008.

KARIN, M. Inflammation and cancer: the long reach of Ras. **Nat. Med.**, v. 11, n. 1, p. 20-21, 2005.

KASAMA, T. et al. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v. 4, n. 3, p. 273-279, 2005.

KEYS, A. et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. **Am. J. Epidemiol.**, v. 124, n. 6, p. 903-915, 1986.

LEITE, M. S. et al. Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet. **Shock**, v. 23, n. 2, p. 173-178, 2005.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 9, p. 678-689, 2007.

LI, G. et al. c-Jun is essential for organization of the epidermal leading edge. **Dev. Cell.**, v. 4, n. 6, p. 865-877, 2003.

LIU, W.; SAINT, D. A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of

polymerase chain reaction kinetics. **Anal. Biochem.**, v. 302, n. 1, p. 52-59, 2002.

MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75-81, 1997.

MARTIN, P.; PARKHURST, S. M. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. **Development**, v. 131, n. 13, p. 3021-3034, 2004.

MARTINS DE LIMA, T. et al. Mechanisms by which fatty acids regulate leucocyte function. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 113, n. 2, p. 65-77, 2007.

MASTRANGELO, A. M. et al. Oleic acid increases cell surface expression and activity of CD11b on human neutrophils. **J. Immunol.**, v. 161, n. 8, p. 4268-4275, 1998.

MATA, P. et al. Effect of dietary fat saturation on LDL oxidation and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 16, n. 11, p. 1347-1355, 1996.

MCCUSKER, M. M.; GRANT-KELS, J. M. Healing fats of the skin: the structural and immunologic roles of the omega-6 and omega-3 fatty acids. **Clin. Dermatol.**, v. 28, n. 4, p. 440-451, 2010.

MOLLINEDO, F. et al. Novel trends in neutrophil structure, function and development. **Immunol. Today**, v. 20, n. 12, p. 535-537, 1999.

MOORE, K. Cell biology of chronic wounds: the role of inflammation. **J. Wound Care**, v. 8, n. 7, p. 345-348, 1999.

MORGAN, M. J.; LIU, Z. G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. **Cell Res.**, v. 21, n. 1, p. 103-115, 2011.

MOUSSA, M. et al. In vivo effects of olive oil-based lipid emulsion on lymphocyte activation in rats. **Clin. Nutr.**, v. 19, n. 1, p. 49-54, 2000.

MURPHY, J. E. et al. Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. **J. Invest. Dermatol.**, v. 114, n. 3, p. 602-608, 2000.

NAKAMURA, Y. et al. 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.**, v. 35, n. 9, p. 997-1007, 2003.

NOVAK, T. E. et al. NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 284, n. 1, p. L84-89, 2003.

OTRANTO, M. et al. Effects of supplementation with different edible oils on cutaneous wound healing. **Wound Repair Regen.**, v. 18, n. 6, p. 629-636.

PARK, N. Y. et al. Effect of dietary conjugated linoleic acid supplementation on early inflammatory responses during cutaneous wound healing. **Mediators Inflamm.**, v. 2010, p 1-8, 2010.

PEREIRA, L. M. et al. Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. **Cell Biochem. Funct.**, v. 26, n. 2, p. 197-204, 2008.

PETRI, B. et al. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. **J. Immunol.**, v. 180, n. 10, p. 6439-6446, 2008.

PIEPER, B.; CALIRI, M. H. Nontraditional wound care: A review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. **J. Wound Ostomy Continence Nurs.**, v. 30, n. 4, p. 175-183, 2003.

PIETTE, M.; SAUGIER, J. [Effect of the intravenous infusion of a lipid emulsion on blood leukocytes in the rabbit]. **Ann. Pharm. Fr.**, v. 28, n. 9, p. 529-534, 1970.

PRICE, D. T.; LOSCALZO, J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. **Am. J. Med.**, v. 107, n. 1, p. 85-97, 1999.

RHEE, S. G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. **Exp. Mol. Med.**, v. 31, n. 2, p. 53-59, 1999.

RIOS-SANTOS, F. et al. A critical role of leukotriene B4 in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligation and puncture sepsis. **Shock**, v. 19, n. 1, p. 61-65, 2003.

RISERUS, U. Fatty acids and insulin sensitivity. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 11, n. 2, p. 100-105, 2008.

RODRIGUES, H. G. et al. Dietary free oleic and linoleic acid enhances neutrophil function and modulates the inflammatory response in rats. **Lipids**, v. 45, n. 9, p. 809-819.

ROLLINS, B. J. et al. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. **Blood**, v. 78, n. 4, p. 1112-1116, 1991.

ROY, S. et al. Dermal wound healing is subject to redox control. **Mol. Ther.**, v. 13, n. 1, p. 211-220, 2006.

RUSYN, I. et al. Corn oil rapidly activates nuclear factor-kappaB in hepatic Kupffer cells by oxidant-dependent mechanisms. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 11, p. 2095-2100, 1999.

SADEGHI, S. et al. Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 404-410, 1999.

SALAS, A. et al. Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction. **Immunity**, v. 20, n. 4, p. 393-406, 2004.

SAMBROOK, J. R., D.W. . **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANDERSON, P. et al. Dietary lipid modulation of cell mediated immunity in the rat. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 23, n. 2, p. 273S, 1995.

SCAPINI, P. et al. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunol. Rev.**, v. 177, p. 195-203, 2000.

SENGELOV, H. et al. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. **J. Clin. Invest.**, v. 92, n. 3, p. 1467-1476, 1993.

SHANLEY, T. P. et al. Requirement for C-X-C chemokines (macrophage inflammatory protein-2 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant) in IgG immune complex-induced lung injury. **J. Immunol.**, v. 158, n. 7, p. 3439-3448, 1997.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 in cell proliferation and survival. **Oncogene**, v. 20, n. 19, p. 2390-2400, 2001.

SHIBATA, F. et al. Recombinant production and biological properties of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants, GRO/CINC-2 alpha, CINC-2 beta and CINC-3. **Eur. J. Biochem.**, v. 231, n. 2, p. 306-311, 1995.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 233, n. 6, p. 674-688, 2008.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

SURESH, Y.; DAS, U. N. Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus: effect of omega-6 fatty acids. **Nutrition**, v. 19, n. 2, p. 93-114, 2003.

THONSOM. **The cytokine handbook**. 3rd. ed. London, 1998.

TOBAR, N. et al. RAC1 activity and intracellular ROS modulate the migratory potential of MCF-7 cells through a NADPH oxidase and NFkappaB-dependent mechanism. **Cancer Lett.**, v. 267, n. 1, p. 125-132, 2008.

TSANG, W. M. et al. Effect of fatty acid mixtures on phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes of different species. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 5, n. 1, p. 153-154, 1977.

TSIMIKAS, S. et al. LDL isolated from Greek subjects on a typical diet or from American subjects on an oleate-supplemented diet induces less monocyte chemotaxis and adhesion when exposed to oxidative stress. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, n. 1, p. 122-130, 1999.

TSIROGIANNI, A. K. et al. Wound healing: immunological aspects. **Injury**, v. 37, p. S5-S12, 2006. Suppl 1

TSUZUKI, Y. et al. Enhanced lymphocyte interaction in postcapillary venules of Peyer's patches during fat absorption in rats. **Gastroenterology**, v. 112, n. 3, p. 813-825, 1997.

ULICH, T. R. et al. Intratracheal administration of endotoxin and cytokines. VI. Antiserum to CINC inhibits acute inflammation. **Am. J. Physiol.**, v. 268, n. 2, pt 1, p. L245-L250, 1995.

US DEPARTMENT OF AGRICULTURE, A. R. S. **Nutrient intakes from food: mean amounts consumed per individual One Day, 2005-2006.** Disponível em <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/fsrg>. Acesso em 15 nov 2009.

VIDGREN, H. M. et al. Incorporation of n-3 fatty acids into plasma lipid fractions, and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil, and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young men. **Lipids**, v. 32, n. 7, p. 697-705, 1997.

WALZ, A. et al. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 149, n. 2, p. 755-761, 1987.

WELLS, T. N. et al. Chemokine blockers--therapeutics in the making? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 27, n. 1, p. 41-47, 2006.

WOLACH, B. et al. Improved chemotactic ability of neonatal polymorphonuclear cells induced by mild membrane rigidification. **J. Leukoc. Biol.**, v. 51, n. 4, p. 324-328, 1992.

YAQOUB, P. Monounsaturated fats and immune function. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 4, p. 453-465, 1998.

YAQOUB, P. et al. Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 67, n. 1, p. 129-135, 1998.

YATES, S.; RAYNER, T. E. Transcription factor activation in response to cutaneous injury: role of AP-1 in reepithelialization. **Wound Repair Regen.**, v. 10, n. 1, p. 5-15, 2002.

ZHAO, G. et al. Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. **J. Nutr.**, v. 134, n. 11, p. 2991-2997, 2004.

ZHOU, M. et al. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Anal. Biochem.**, v. 253, n. 2, p. 162-168, 1997.