DOUGLAS AMARAL DOS SANTOS

EFEITOS DA ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SOBRE O RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM FIBROBLASTOS

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

São Paulo

2015

DOUGLAS AMARAL DOS SANTOS

EFEITOS DA ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SOBRE O RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM FIBROBLASTOS

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos

Co-Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Ortis

Versão original

São Paulo

2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Santos, Douglas Amaral dos.
Efeitos da elevada concentração de glicose sobre o retículo endoplasmático em fibroblastos / Douglas Amaral dos Santos. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia do movimento celular.

Versão do título para o inglês: Effects of high concentration on the endoplasmic reticulum of fibroblasts.

1. Diabetes Mellitus 2. Fibroblasto 3. Estresse do RE 4. Hiperglicemia I. Santos, Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0110/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Douglas Amaral dos Santos.

Título da Dissertação: Efeitos da elevada concentração de glicose sobre o retículo endoplasmático em fibroblastos.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

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

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

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

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **123** nas fls. **11** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Marinilce Fagundes dos Santos,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudo da atividade funcional de fibroblastos na cicatrização de ratos diabéticos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Cibele Crastequini Gomes, Douglas Amaral dos Santos, Maíra Estanislau Soares de Almeida, Cilene Rebouças de Lima, Mariana Marin Monteiro, Kelly Salzmann Monteiro, Ana Flávia Marçal Pessoa, Robson Lucas Pontes,Caroline Alves de Oliveira Xavier, Paula Rodrigues Sampaio,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **26.09.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 30 de setembro de 2013.

p/ Dunes

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Aos meus pais Roseli e Edvaldo, e a minha namorada Débora, pelo incentivo e apoio constante.

Obrigado

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos, pela oportunidade, por ser uma grande orientadora e igualmente amiga. Pelo entusiasmo e por sempre me motivar. Agradeço por sempre me colocar “no trilho”, sabendo dizer sempre a coisa certa na hora certa. Pelo ótimo convívio que temos, pelo bom humor e pela paciência.

A minha co-orientadora Profa. Dra.Fernanda Ortis, por me aceitar como seu “meio aluno”, por abrir seu laboratório para que eu realizasse parte dos experimentos e também por permitir que eu participasse da montagem do laboratório. Pela confiança, conselhos e pela disponibilidade sempre que necessitei.

A Dra. Cilene Rebouças de Lima, por ser uma grande amiga, pelas risadas, por sempre estar disposta a me ajudar e aconselhar, tanto em assuntos científicos como pessoais. Pelo entusiasmo e otimismo e por ter muita paciência para suportar minha “rabugentisse”, se é que essa palavra existe.

A Dra. Paola Cristina Branco, por acreditar em mim mais do que eu mesmo acreditava e não me deixar desistir. Por permitir que eu participasse de uma parte do seu doutorado e pelos ensinamentos que me passou nesse período. Agradeço pela amizade que temos e que espero levar pra vida toda.

A Gabriella Malheiros Moraes, por todo auxílio no laboratório, por ser uma grande amiga “somente na Pessoa Jurídica”, pelos nossos debates sobre os mais diversos temas e por todos os “*bullying artes*” que fizemos um contra o outro ou com os “coleguinhas de laboratório”.

A todos integrantes do laboratório do Movimento Celular, Mariana Monteiro, Maíra Almeida, Carol Serna, Robson Pontes, Cibele Gomes, Carol Xavier e Álvaro Junco pelo convívio, apoio e aprendizado.

A Profa.Dra. Alison Colquhoun, por todo auxílio e disposição durante este trabalho, por sempre estar de bom humor e pela paciência, por não me chutar de seu laboratório em todas as 450 vezes em que fui pedir ajuda. A todos os integrantes de seu laboratório Renata Gomes, Felipe Souza, Tatiane Freitas, Matthew Ferreira, Lucas Rossetti e Janaína Silva e Marley por toda ajuda e amizade, e por me aguentarem nas mesmas 450 vezes em que estive por lá.

Ao Professor Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva e professor João Carlos Shimada Borges pela oportunidade na iniciação científica e por todos os nossos debates políticos, científicos e qualquer outro assunto da moda, e a todos do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva, Alfonso, Andrews, Joana, João, Karina, Leandro, Luciana, Paula, Renan, e Yoel e pelos que já saíram, Camila, Gabriel, Renata e Tânia pela amizade e apoio desde o início.

À Emilia Ribeiro, grande amiga que me acompanha desde a iniciação científica até hoje.

Ao Gaspar, pelo grande auxílio e ensinamentos sobre microscopia eletrônica.

Ao Edson, pelo auxílio no microscópio eletrônico.

Ao Mario, pelo auxilio nos experimentos de microscopia confocal.

A Regina Valbom pela disposição e boa vontade em me ajudar.

A todos os funcionários do ICB aos quais gostaria de destacar, Sayami, Adriane, Edilberto, Marley, Braz, Claudio e Fernando.

As funcionárias da limpeza, por não me xingarem nas vezes em que pisei no chão molhado ou atrasei o serviço delas.

A Coordenadoria da Pós-Graduação pelo auxílio prestado.

Aos laboratórios da Profa. Dra. Dânia Emi Hamassaki, do Prof. Dr. Fabio Siviero e da Profa. Dra. Marilia Cerqueira Leite Seelaender pelo auxílio sempre que necessitei.

Aos docentes do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, pelos ensinamentos nas disciplinas.

Aos professores da disciplina de Embriologia Molecular, Profa. Dra. Chao Yun Irene Yan, Profa. Dra. Fabio Siviero e Profa. Dra. Nathalie Cella pelos valorosos ensinamentos e pelo entusiasmo durante as aulas.

A Profa. Dra. Maria Martha Bernardi, pela oportunidade dada na iniciação cientifica.

Aos meus pais, Roseli e Edvaldo, por me darem suporte sempre e por me orientarem; por terem paciência em ouvir todas as minhas histórias difíceis de entender e, por NUNCA terem me perguntado quando eu começaria a “trabalhar de verdade”.

A minha namorada Débora, por me apoiar, aguentar a minha “choradeira”; por ter tanta paciência e estar sempre presente em todos os momentos, desde o início na escola até os dias de hoje.

Ao Fabio Feitosa, um grande amigo que levarei para vida toda, por todos os conselhos e broncas que tanto me ajudaram e por ser uma grande referência como pessoa.

Ao Dr. Ricardo Borges, pelas nossas valorosas conversas nas quais tanto aprendi, pela amizade e pela paciência em me explicar e discutir vários temas científicos.

A CAPES, ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Cair sete vezes, levantar oito

Provérbio Japonês

RESUMO

SANTOS, D. A. **Efeitos da elevada concentração de glicose sobre o retículo endoplasmático em fibroblastos.** 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O Diabetes Mellitus (DM) é uma desordem metabólica que acomete de forma crescente milhões de indivíduos em todo o mundo. Independentemente de sua etiologia, é caracterizado pela hiperglicemia crônica, que promove estresse oxidativo e formação de produtos de glicação avançada nos tecidos. Estes efeitos são os responsáveis pelas complicações de longo prazo do DM, dentre elas a cicatrização deficiente. Fibroblastos são células essenciais na cicatrização da derme, sendo responsáveis pela síntese e degradação de matriz extracelular (MEC), assim como pela contração da ferida. Nosso laboratório demonstrou previamente uma migração e adesão deficientes de fibroblastos derivados de ratos diabéticos em matrizes de diferentes composições e dimensões, além de uma redução na expressão de diferentes integrinas e da matriz pericelular de fibronectina. Essas células apresentaram ainda dilatação significativa do retículo endoplasmático (RE) e um aumento no número de mitocôndrias e vesículas intracelulares. O efeito sobre a migração de fibroblastos foi observado tanto em células provenientes de animais diabéticos quanto em linhagens expostas à glicose elevada. Esse estudo teve como objetivo avaliar se a glicose elevada induz estresse do RE, resultando na ativação da via UPR (*Unfolded Protein Response*). Conforme observado por microscopia eletrônica de transmissão, células NIH-3T3 expostas por 3 dias a uma elevada concentração de glicose apresentaram dilatação do RE quando comparadas a células cultivadas sob baixa concentração de glicose. As células apresentaram também alteração na morfologia das mitocôndrias, compatível com o fenômeno conhecido como "*mitochondrial swelling*". A expressão dos marcadores de estresse do RE: BiP, XBP1 spliced (XBP1s) e CHOP não foi alterada pela exposição destas células à elevada concentração de glicose. Resultados semelhantes foram observados em fibroblastos derivados de animais diabéticos, quando comparados a animais controle. Adicionalmente, um indicador fluorescente do potencial de membrana mitocondrial (JC-1) apresentou sinal semelhante em células NIH-3T3 expostas à elevada ou baixa concentração de glicose durante 3 dias. Esses resultados sugerem que a disfunção de fibroblastos frente à exposição a uma elevada concentração de glicose não está diretamente relacionada a uma indução do estresse de RE.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus. Fibroblasto. Estresse do RE. Hiperglicemia.

ABSTRACT

SANTOS, D. A. **Effects of high glucose concentration on the endoplasmic reticulum of fibroblasts.** 2015. 54 p. *Masters thesis* (*Cell and Tissue Biology*). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Regardless of its etiology, Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia, which promotes oxidative stress and the formation of advanced glycation end products in tissues. These effects are related to long-term complications of DM, i.e. deficient wound healing. Fibroblasts are essential for the dermal healing process, synthesizing and degrading extracellular matrix (ECM), as well as collaborating for wound contraction. Our research group has previously demonstrated impaired adhesion and migration of fibroblasts derived from diabetic rats on ECM of different compositions and dimensions, in addition to a reduction in the expression of various ECM receptors and pericellular fibronectin matrix. Those cells also exhibited significant enlargement of the endoplasmic reticulum (ER) cisternae, an increase in the number of mitochondria and intracellular vesicles. Migration impairment was observed both in fibroblasts derived from diabetic animals and in cell lineages exposed to high glucose in vitro for 3 days. The aim of this study was to assess whether high glucose induces ER stress, resulting in the activation of the UPR (Unfolded Protein Response). As observed by transmission electron microscopy, NIH-3T3 cells exposed for 3 days to a high concentration of glucose showed enlargement of RE cisternae compared to cells grown under low glucose concentration. Cells also showed alterations in the morphology of mitochondria, compatible with the phenomenon known as "mitochondrial swelling". Expression of the ER stress markers BiP, spliced XBP1 (XBP1s) and CHOP was not altered by exposure of these cells to high glucose. Similar results were observed in fibroblasts derived from diabetic animals compared to control animals. Additionally, a fluorescent indicator of mitochondrial membrane potential (JC-1) showed similar labeling in NIH-3T3 cells exposed to high or low glucose concentration over 3 days. These results suggest that fibroblasts dysfunction caused by exposure to high glucose concentration is not directly related to an induction of ER stress.

Keywords: Diabetes Mellitus. Fibroblast. ER stress. Hyperglycemia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Efeitos da glicose elevada sobre a morfologia de fibroblastos NIH-3T3.....33

Figura 2- O "splicing" alternativo de XBP1 não é modulado pela glicose elevada em células NIH-3T3 34

Figura 3- A expressão de CHOP não é induzida pela concentração elevada de glicose em células NIH-3T3 35

Figura 4- O Diabetes Mellitus não altera a expressão de CHOP em fibroblastos expostos à alta concentração de glicose..... 36

Figura 5- A expressão de BIP/GRP78 não é modulada pela concentração elevada de glicose em células NIH-3T3 37

Figura 6- A alta concentração de glicose diminui a expressão de BIP/GRP78 em cultura primária de fibroblastos dérmicos de rato..... 38

Figura 7- A alta concentração de glicose altera a morfologia de mitocôndrias em células NIH-3T3..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs – Produtos finais de glicação avançada

ATF6 – activating transcription fator 6

BiP – Binding Protein

CHO – Chinese hamster ovary

CHOP – C/EBP homologous protein

DM – Diabetes mellitus

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

eIF2α – eIF2-alpha

ERAD – ER associated degradation

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GRP78 – Glucose Related Protein 78

IRE1 – inositol requiring kinase 1

NEAA – Aminoácidos não essenciais

PERK – PKR-like endoplasmic reticulum kinase

RE – Retículo Endoplasmático

REL – Retículo Endoplasmático Liso

RER – Retículo Endoplasmático Rugoso

SERCA – sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPas

SFB – Soro Fetal Bovino

TG – Tapsigargina

UPR – Unfolded Protein Response

XBP1 – X-box binding protein 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

1.1 Considerações gerais 16

1.2 Disfunções celulares causadas pela hiperglicemia 17

1.3 Glicose elevada e estresse do RE 21

1.4 Regulação do retículo endoplasmático pela UPR 22

1.5 Efeitos do Diabetes Mellitus na função de fibroblastos 24

2 OBJETIVOS 24

2.1 Objetivos específicos 24

3 MATERIAIS E MÉTODOS 25

3.1 Animais e indução do Diabetes Mellitus 25

3.2 Cultura primária de fibroblastos dérmicos de animais controle e diabéticos 25

3.3 Cultura de linhagem de fibroblastos – NIH-3T3 26

3.4 Cultura celular e tratamentos para avaliação do retículo endoplasmático 26

3.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) 27

3.6 Análise de expressão proteica por W*estern Blotting* 27

3.7 Análise do potencial de membrana mitocondrial 28

3.8 Análise estatística 28

4 RESULTADOS 30

4.1 Efeitos da concentração elevada de glicose sobre a morfologia de fibroblasto NIH-3T3 30

4.2 Efeitos da concentração elevada de glicose sobre a expressão de proteínas da UPR NIH-3T3 32

5 DISCUSSÃO 39

6 CONCLUSÃO 43

REFERÊNCIAS 44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica de origem multifatorial caracterizada pela hiperglicemia crônica, acometendo aproximadamente 347 milhões de pessoas em todo o mundo. Trata-se de uma patologia crescente, fortemente associada a hábitos alimentares, sedentarismo e ao envelhecimento da população. O Brasil encontra-se entre os dez países com maior incidência desta doença (*WORLD HEALTH ORGANIZATION*, 2013). Independentemente de sua etiologia, a hiperglicemia crônica leva, em um longo prazo, a diversas complicações clínicas, principalmente relacionadas ao estresse oxidativo e à formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Os AGEs ligam-se aleatoriamente a proteínas intracelulares e extracelulares, potencialmente afetando sua função (PACHER et al., 2007).

As respostas dos tecidos às condições diabéticas são variadas, dependendo de quanta glicose as células transportam para o meio intracelular e das defesas antioxidantes de cada tipo celular (BROWNLEE, 2001). Dentre as principais complicações causadas pelo DM destacam-se as alterações microvasculares, a neuropatia, a retinopatia, a nefropatia diabética e a cicatrização deficiente (TSILIBARY, 2003; WILLIAMS, 1992). Alterações precoces na microvascularização promovem aumento da permeabilidade vascular e alterações do fluxo sanguíneo, contribuindo para o surgimento de feridas cutâneas crônicas, principalmente em membros inferiores (AGUIAR; VILLELA; BOUSKETA, 2007).

1.2 Disfunções celulares causadas pela hiperglicemia

Em condições hiperglicêmicas, a elevada concentração de glicose circulante e no líquido intersticial pode levar a um aumento na captação e metabolismo deste monossacarídeo por alguns tipos celulares, ocasionando um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas mitocôndrias (BROWNLEE, 2001). Sendo assim, quanto maior a capacidade das células de captar a glicose extracelular, maior o dano causado pela hiperglicemia.

EROs em excesso superam as defesas celulares antioxidantes, podendo interagir com diferentes moléculas (p.ex. lipídeos e proteínas), potencialmente

inativando ou alterando sua função. Uma das proteínas cuja função é frequentemente inibida pelo estresse oxidativo é a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que atua na via glicolítica. A inibição da função de GAPDH gera um aumento de metabólitos em etapas anteriores da via, levando à ativação de vias metabólicas paralelas como a via dos polióis, via das hexosaminas, ativação de diferentes isoformas de proteína cinase C e formação de AGEs (BROWNLEE, 2001). De maneira geral, a ativação destas vias modifica a expressão gênica e gera um aumento do estresse oxidativo devido ao aumento de geração de EROs e depleção de defesas antioxidantes celulares.

O aumento na formação de EROs promove frequentemente lesão tecidual e está relacionado a muitas complicações de longo prazo do DM (HALLIWELL, 1996; JOHANSEN et al., 2005; VALKO et al., 2007). AGEs, derivados da glicose, fazem uma modificação pós-traducional, não enzimática, de diferentes proteínas e também alteram lipídios e ácidos nucleicos (INAGI, 2011). Estes compostos formam ligações cruzadas prejudiciais a diversas macromoléculas, podendo afetar diferentes funções celulares por meio de diversas vias de sinalização (WU et al., 2014). Além disso, proteínas glicadas podem ser mais resistentes à degradação enzimática, levando a um acúmulo nos tecidos. Componentes da MEC, por apresentarem meia-vida prolongada, são frequentemente alterados por AGEs (revisado GOH;COOPER, 2008). O colágeno glicado, por exemplo, induz a apoptose de fibroblastos dérmicos humanos (ALIKHANI et al., 2005, 2007; LOUGHLIN; ARTLETT, 2010).

Os AGEs são importantes mediadores de danos celulares causados pela hiperglicemia e no desenvolvimento de diferentes complicações do DM, inclusive complicações cardiovasculares (LAKSHMANAN et al., 2013). No tecido ósseo, prejudicam células osteoblásticas (ALIKHANI et al., 2007; TANAKA et al., 2013).

Alguns dos prejuízos induzidos por AGES estão associados a alterações na homeostase do Reticulo Endoplasmático (RE) e à indução do estresse desta organela (TANAKA et al., 2013, WU et al., 2014). A concentração elevada de glicose induz estresse do RE em adipócitos (TANIS et al., 2015) e células endoteliais (KARBACH et al., 2012; MOORADIAN; HAAS, 2011; SHEIKH-ALI et al., 2010; WU et al., 2014). Também induz apoptose via estresse do RE em cardiomiócitos (YOUNCE, 2013), podócitos (CAO et al., 2014) e células β pancreáticas, além de induzir sua disfunção (CNOP et al., 2010).

1.3 Glicose elevada e estresse do RE

O RE se distingue morfologicamente em 2 tipos: rugoso (RER) e liso (REL). O RER possui ribossomos associados às suas membranas e é formado por cisternas. No seu interior existem diversas chaperonas e outras proteínas que auxiliam no enovelamento e nas modificações pós-traducionais de proteínas; dependendo de seu destino final, estas proteínas serão transferidas para e processadas pelo Complexo de Golgi, podendo ser levadas para vias secretórias (RON; WALTER, 2007). O REL é formado por estruturas tubulares livres de ribossomos (AGOSTINIS; SAMALI, 2012), onde ocorre a detoxificação de drogas, biossíntese de esteróides e ácidos graxos e estoque de Ca^{2+} (VOELTZ; ROLLS; RAPOPORT, 2002). Esses dois tipos são contínuos e suas proporções nas células variam de acordo com a atividade de cada tipo celular.

O tamanho e formato do RE podem mudar drasticamente (BORGESE; FRANCOLINI; SNAPP, 2006). Células com elevada demanda secretória, como por exemplo células β pancreáticas, plasmócitos (SHAFFER et al., 2004) e fibroblastos (SRIBURI et al., 2004) possuem RER muito extenso para suprir a alta quantidade de proteínas que são necessárias para vias secretórias (SCHUCK et al., 2009). O REL é abundante em células do fígado, células produtoras de esteróides, neurônios e músculos (devido ao armazenamento de cálcio). As atividades de REL variam de acordo com a função de cada tipo celular, como na produção de esteróides e controle da sinalização por Ca^{2+} nos músculos.

A hiperglicemia induz estresse do RE de várias formas, dentre elas a diminuição da atividade do proteassoma (demonstrado em células β pancreáticas) (BROCA et al., 2014) e estresse oxidativo (BAEK et al., 2012; XUE et al., 2005). Alterações no estado redox do RE promovidas pela glicose excessiva afetam negativamente o enovelamento de proteínas, ocasionando acúmulos proteicos nas cisternas (CHARLES; EATON, 2008; TANG et al., 2012). Alterações funcionais do RE, por sua vez, aumentam a formação de EROs, constituindo-se numa via de retroalimentação positiva (HAYNES; TITUS; COOPER, 2004). Por outro lado, alguns estudos mostraram que o tratamento de células endoteliais expostas à elevada concentração de glicose com antioxidantes não restaurou a homeostase do RE, sugerindo que esses eventos também podem ocorrer em paralelo e que o estresse

oxidativo não responde pela totalidade do problema (MOORADIAN; HAAS, 2011; SHEIKH-ALI et al., 2010).

De maneira geral, perturbações na função normal do RE resultam num desequilíbrio entre a quantidade de proteínas que não adquiriram sua conformação final e a capacidade da maquinaria celular de processar este conteúdo, gerando acúmulo de proteínas mal enoveladas e estresse do RE. Nestas condições uma via sinalizadora é ativada, denominada UPR (*Unfolded Protein Response*) (GROENENDYK; MICHALAK, 2005; RON; WALTER, 2007; SCHRODER; KAUFMANN, 2005;). A ativação da via UPR tem como função o reestabelecimento do balanço entre a capacidade de enovelamento e a carga proteica, resultando na sobrevivência celular. Se o estresse do RE é crônico e a ativação da UPR é mantida sem que haja reestabelecimento da função celular normal, pode ocorrer a indução de morte celular (GROENENDYK; MICHALAK, 2005; RON; WALTER, 2007; TABAS; RON, 2011; WATER; RON, 2011). Os mecanismos para a transição entre adaptação ao estresse do RE e morte celular induzida pelo estresse do RE são ainda pouco conhecidos.

1.4 Regulação do retículo endoplasmático pela UPR

O RE é uma rede de membranas que se estende a partir do envelope nuclear para a periferia da célula (BORGESE; FRANCOLINI; SNAPP, 2006; SHIBATA et al., 2006). Esta organela desempenha papel importante na biossíntese lipídica e proteica, participa da detoxificação e constitui um estoque de Ca^{2+}. Exerce uma importante função no controle da sinalização por Ca^{2+} nas células (BERRIDGE, 2002; VERKHRATSKY, 2002) e na manutenção de sua concentração tanto no citoplasma quanto em seu lúmen. De fato, diversas chaperonas residentes no RE dependem do Ca^{2+} para sua atividade (SCHRODER; KAUFMAN, 2005). Assim, o RE é responsável por manter um ambiente essencial para proteínas destinadas para as vias secretórias (proteínas de membrana ou secretadas pelas células); no RE estas proteínas são sintetizadas e enoveladas, adquirindo sua conformação nativa (AGOSTINIS; SAMALI, 2012).

A UPR é uma via importante para a manutenção da homeostase celular e apresenta algumas características muito conservadas, de leveduras a humanos (BERNALES; MCDONALD; WALTER, 2006; GROENENDYK; MICHALAK, 2005;

SCHRODER; KAUFMAN, 2005; RON; WALTER, 2007). Esta via é ativada por sensores moleculares transmembranares presentes na membrana do RE, sensíveis ao acúmulo de proteínas mal enoveladas: "*Activating Transcription Fator"* 6 (ATF6), "*Inositol Requiring Kinase"* 1 (IRE1) e "*PKR-likeE Endoplasmic Reticulum Kinase"* (PERK). Estas três proteínas permanecem inativas quando ligadas à chaperona BiP/GRP78; esta chaperona também se liga a proteínas ainda não enoveladas, prevenindo sua agregação, e auxilia no enovelamento (CHAMBERS; MARCINIAK, 2014). A elevação da quantidade de proteínas mal enoveladas reduz a disponibilidade de BiP para ligar-se aos sensores, permitindo assim sua ativação. Nesse caso há a dimerização e auto-fosforilação de IRE1 e PERK, que participarão de vias de sinalização que induzirão a expressão gênica de proteínas importantes para regularização da homeostase do RE, induzindo aumento da expressão de chaperonas do RE, proteínas envolvidas na degradação de excesso de proteínas mal formadas (ERAD) e proteínas envolvidas na produção de lipídios para formação de membranas citoplasmáticas, entre outros (RON; WALTER, 2007). Por outro lado, a ativação de PERK leva a uma redução, via fosforilação de eIF2α, da tradução de proteínas no geral, para diminuir seu acúmulo no RE (BACK; KAUFMAN, 2012). O desligamento de ATF6 de BiP faz com que essa proteína seja translocada para o aparelho de Golgi, onde é clivada, levando à sua ativação como um fator de transcrição, que irá regular a expressão gênica de diversas proteínas envolvidas na regulação da homeostase do RE (BOOT-HANDFORD; BRIGGS, 2010).

De forma geral, a UPR resulta na expansão do volume do RE, maior capacidade de dobramento de proteínas, redução da síntese por meio do controle de transcrição e tradução e aumento da remoção de proteínas mal enoveladas por degradação (RON; WALTER, 2007). Quando esses mecanismos falham, por defeitos em uma ou outra via ou por que os fatores que levam à indução do estresse do RE são crônicos, vias de morte celular são ativadas (KIM et al., 2008) através da indução de *C/EBP Homologous Protein* (CHOP) (MARCINIAK et al., 2004).

A apoptose induzida pelo estresse do RE é um importante fator patogênico de várias doenças como diabetes e doenças neurodegenerativas (TABAS; RON, 2011). Por estar intimamente relacionada à sua função, células secretoras parecem ser mais susceptíveis à ativação do estresse de RE, o que além da indução da morte, leva a uma perda de função que pode ser momentânea ou crônica (OSLOWSKI; URANO, 2011).

A UPR pode controlar a expansão do RE, aumentando seu tamanho. Através da ativação de IRE1 induz o “splicing” do mRNA do fator de transcrição X – Box Binding Protein 1 (XBP-1), estimulando a biossíntese lipídica e aumentando o volume do RE em linfócitos B, fibroblastos (SHAFFER et al., 2004; SRIBURI et al., 2004, 2007) e glândulas exócrinas (LEE et al., 2005). Interessantemente, em leveduras, a ativação de IRE1α também induz Hac1 (homólogo de XBP1 em leveduras), expandindo o RE (SCHUCK et al., 2009). Outra proteína da UPR, ATF6, também pode modular a expansão do RE em fibroblastos e células CHO, mesmo sem a atuação de XBP1 “spliced” (XBP-1s) (BOMMIASAMY et al., 2009). Esse aumento do volume do RE pode aliviar o estresse do mesmo, podendo ocorrer independentemente do aumento nos níveis de chaperonas (SCHUCK et al., 2009). Em células β pancreáticas, o tratamento com palmitato induz estresse do RE e alterações em sua morfologia (KARASKOV et al., 2006; WIKSTROM et al., 2013); essas alterações podem ocorrer também após a exposição dessas células a outros indutores de estresse do RE, demonstrando que a dilatação das cisternas e aumento do volume do RE podem, em diferentes situações e tipos celulares, ser associados ao estresse desta organela (CHOW et al., 2014; WIKSTROM et al., 2013).

1.5 Efeitos do Diabetes Mellitus na função de fibroblastos

Conforme já mencionado anteriormente, uma das complicações promovidas pelo DM a longo prazo é a deficiência na cicatrização de feridas. Feridas dérmicas crônicas em indivíduos diabéticos são multifatorias, e a função de fibroblastos é essencial na sua cicatrização (SINGER; CLARK, 1999). Em suas diferentes fases a cicatrização envolve a proliferação e migração de diversos tipos celulares (p.ex. queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos) (GURTNER et al., 2008; MARTIN, 1997). Ao final da fase inflamatória, fibroblastos proliferam e migram para o local da ferida, sintetizando uma matriz provisória rica em colágeno III e fibronectina, além de outras glicoproteínas da MEC. Alguns fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos, responsáveis pela contração da ferida. Numa fase mais tardia, os fibroblastos remodelam a MEC, sintetizando e degradando MEC ativamente. Apesar da importância dos fibroblastos para o processo cicatricial, poucos estudos têm

abordado a influência da hiperglicemia sobre a função e, especialmente, sobre a migração destas células.

Sabe-se que fibroblastos derivados de úlceras crônicas de pacientes diabéticos proliferam menos que aqueles derivados de pacientes normais e respondem diferentemente a fatores mitogênicos (LOOTS et al., 1999, 2002). Lerman et al. (2003) verificaram também uma diminuição da migração de fibroblastos de camundongos diabéticos, especialmente em resposta à hipóxia.

Nosso grupo de pesquisa, um estudo anterior, demonstrou que diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos, migram menos sobre fibronectina na presença de uma elevada concentração de glicose in vitro, apresentando menor velocidade e direcionalidade. Este efeito foi acompanhado de protrusões não produtivas e instáveis e redução na maturação de adesões junto à MEC. Verificou-se ainda que muitos dos efeitos da glicose elevada foram parcial ou totalmente resgatados com um agente antioxidante (LAMERS et al., 2011). Interessantemente, este efeito foi observado em magnitude similar tanto em fibroblastos dérmicos derivados de culturas primárias de ratos diabéticos quanto em linhagens celulares expostas à elevada concentração de glicose (25 mM) por pelo menos 3 dias. Naquele estudo foram utilizados fibroblastos murinos NIH-3T3, fibroblastos murinos embrionários (MEFs, cultura primária) e células epiteliais CHO (LAMERS et al., 2011). Estes resultados validam o modelo de exposição in vitro à glicose elevada para algumas disfunções celulares observadas no DM, como p. ex. a migração celular deficiente.

Estudos subsequentes do mesmo grupo mostraram que fibroblastos dérmicos derivados de ratos diabéticos apresentaram alterações do citoesqueleto, menor migração também sobre substrato de colágeno I, menor adesão e espraiamento associados a uma diminuição da expressão proteica de receptores de colágeno e fibronectina e uma potencial deficiência na via de reciclagem lenta destes receptores (via Rab11), compensada pela via rápida envolvendo a GTPase Rab4 (ALMEIDA et al., em preparação; MONTEIRO, 2014). Dois resultados, no entanto, foram bastante curiosos: o DM reduziu a capacidade dos fibroblastos dérmicos de organizar uma matriz pericelular de fibronectina, o que poderia estar associado a uma deficiência secretória, e também induziu a dilatação das cisternas do RE (ALMEIDA, 2011; Almeida et al., em preparação). Por microscopia eletrônica de transmissão observou-se que fibroblastos derivados de ratos diabéticos apresentavam o RE com cisternas muito dilatadas e preenchidas com material amorfo, um maior número de

mitocôndrias e muitas vesículas intracelulares com conteúdo e função indeterminados (ALMEIDA, 2011). Fibroblastos da linhagem NIH-3T3 expostos à elevada concentração de glicose por 21 dias também apresentaram menor matriz pericelular de fibronectina, sugerindo que uma potencial deficiência secretória poderia ser estudada em um modelo *in vitro* (MONTEIRO, 2014).

Com base nestes resultados e considerando a relação existente na literatura entre o estresse de RE e a alteração morfológica desta organela, decidimos investigar se a glicose elevada induz o estresse de RE em fibroblastos dérmicos e em células NIH-3T3.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal avaliar os efeitos de uma elevada concentração de glicose sobre a morfologia de fibroblastos e sobre uma possível indução de estresse do RE nestas células.

2.1 Objetivos específicos

1- Avaliar os efeitos da elevada concentração de glicose (30 mM) sobre a morfologia de fibroblastos NIH-3T3 em nível ultraestrutural, comparando-os aos efeitos previamente observados em fibroblastos dérmicos derivados de ratos diabéticos.

- Estratégia: em células NIH-3T3 expostas ou não a altas concentrações de glicose durante 3 dias, analisar a morfologia utilizando microscopia eletrônica de transmissão e o potencial de membrana mitocondrial por meio de um marcador específico fluorescente (JC-1) e posterior análise por microscopia confocal.

2- Avaliar se a exposição a altas concentrações de glicose induz o estresse de RE em fibroblastos.

- Estratégia: em fibroblastos derivados de ratos diabéticos e células NIH-3T3 expostas a alta concentrações de glicose, analisar por western blotting a expressão dos marcadores de estresse do RE CHOP, BiP e XBP1s.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e indução do Diabetes Mellitus

O protocolo de pesquisa utilizado está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Ética Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB/USP, sob protocolo número 123 nas fls.11 do livro 03.

Ratos Wistar machos (12 animais) com 2 meses de idade provenientes do Biotério Central do ICB/USP foram utilizados. Estes animais foram divididos em grupo controle e grupo experimental. Após jejum de 12 h e sob anestesia (ketamina 23,2 mg/100 g e xilazina 4,6 mg/100 g de peso corporal), a droga estreptozotocina foi administrada intraperitonealmente nos animais do grupo experimental (60 mg/kg de peso corporal, diluída em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,5), enquanto os animais controle receberam apenas o veículo. A estreptozotocina é uma droga que destrói as células-β do pâncreas (JUNOD et al., 1967). Para evitar um quadro de hipoglicemia severa causada pela liberação de insulina durante a destruição das células-β pancreáticas, uma solução de sacarose 30% foi disponibilizada para todos os animais pelo período de 12 horas. A glicemia desses animais foi medida 24 horas após a indução e no momento do sacrifício. Apenas animais com glicemia superior a 300 mg/dl foram considerados diabéticos. O peso corporal, a ingestão de alimento, a glicemia e a glicosúria foram avaliados para comprovação do estado diabético. Após 30 dias da injeção, os animais foram sacrificados por dose excessiva de ketamina e xilazina.

3.2 Cultura primária de fibroblastos dérmicos de animais controle e diabéticos

Após a anestesia de cada animal, foi realizada a tricotomia da região abdominal e remoção de um fragmento de pele de aproximadamente 4 cm^2. Os fragmentos de derme foram inicialmente raspados com bisturi em meio de cultivo, em condições assépticas e, posteriormente, digeridos com colagenase 0,1% por 1 h a 37 ºC em banho-maria, sob agitação constante. Em seguida a colagenase foi inativada com meio DMEM contendo soro fetal bovino (SFB) 10% e as células presentes na suspensão foram obtidas por centrifugação, ressuspensas em meio de cultura (DMEM contendo 20% SFB, antibióticos - 100 U/ml penicilina / 100 µg/ml

estreptomicina e 1% fungizona, somente na primeira passagem) e cultivadas em estufa umidificada contendo 8% de CO_2/ 92% ar. Posteriormente a concentração de SFB foi reduzida para 10% e as passagens semanais foram realizadas. As células foram cultivadas em meio controle (glicose 5 mM) ou com glicose elevada (30 mM), sendo utilizadas por até 6 passagens.

3.3 Cultura de linhagem de fibroblastos – NIH-3T3

Células da linhagem de fibroblastos murinos NIH-3T3 provenientes da ATCC foram doadas pelo Prof. Dr. Alan F. Horwitz (University of Virginia, USA). As células foram cultivadas em meio DMEM low glucose (glicose 5 mM) suplementado com 10% SFB, 100 U/ml penicilina / 100 µg/ml estreptomicina e 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA - glicina, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-ácido glutâmico, L-prolina, L-serina (Invitrogen, Grand Island, NY). No grupo experimental as células foram cultivadas no mesmo meio, contendo glicose 30 mM, durante 3 dias. Passagens foram realizadas a cada 3-4 dias.

3.4 Cultura celular e tratamentos para avaliação do retículo endoplasmático

Para avaliar os efeitos da glicose elevada sobre o RE, fibroblastos dérmicos foram cultivados em meio controle (contendo glicose 5 mM e aditivos, mimetizando aproximadamente uma glicemia de 90 mg/dL) ou com concentração elevada de glicose (contendo glicose 30 mM e aditivos, mimetizando uma glicemia de 540 mg/dL), até atingir 70% de confluência e, posteriormente coletados para análises de expressão proteica por *western blotting*.

A linhagem NIH-3T3 foi exposta as diferentes concentrações de glicose (5 e 30 mM) por 3 dias. Como controle positivo para indução de estresse do RE, as células foram tratadas após o segundo dia de cultivo com inibidor da bomba Serca2 Ca^{2+} ATPase (Serca2b), Tapsigargina 1 µM (TG) ou o veículo DMSO por 24 h, finalizando 3 dias de tratamento. Todos os grupos experimentais foram coletados para análises por *western blotting*. Para microscopia eletrônica não foi utlizado o indutor de estresse do RE Tapsigargina.

3.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após o tratamento em presença de 5 mM e 30 mM de glicose, células NIH-3T3 foram tripsinizadas, centrifugadas e fixadas em solução de Karnowsky (formaldeído 2,5% e glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2), por 2 horas à temperatura ambiente, e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1 % por 90 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com acetato de uranila 0,5% em solução de sacarose 10,5 % durante a noite e desidratadas em concentrações crescentes de álcool para inclusão em resina Spurr. Ao final, cortes semifinos de 0,5 µm de espessura foram corados com azul de toluidina e cortes ultrafinos de 40-60 nm de espessura foram confeccionados em ultramicrótomo e posicionados em telas de cobre de 200 mesh. O contraste foi realizado com solução de citrato de chumbo. A análise das amostras foi feita em microscópio eletrônico de transmissão JEOL no Laboratório Multiusuários de Microscopia Eletrônica do Depto. de Biologia Celular e do Desenvolvimento do, ICB/USP.

3.6 Análise de expressão proteica por W*estern Blotting*

Inicialmente, células foram lavadas com tampão salina-fosfato (PBS), coletadas em tampão de amostra Laemmli (Azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1 M, glicerol 50%, SDS 10%) contendo β-mercaptoetanol 50 mM e posteriormente incubadas a 100º C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) à temperatura ambiente, em sistema de gel bifásico (gel de empilhamento contendo EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 750 mM, pH 6.7 e gel de resolução contendo EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 50 mM, pH 8.9). A corrida foi efetuada a 70 mA por aproximadamente 2 h em tampão de corrida (Trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%) e, após este período, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad - EUA) em presença de tampão de transferência (Trisma base 30 mM, glicina 192 mM e metanol 20 %), durante 2 h a 200 mA em banho de gelo ou durante a noite a 70 mA em câmara fria. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com a incubação das membranas em leite desnatado 5% diluído em tampão TBS-T (Trisma Base 20 mM, glicina 100

mM, Tween 20 0,1%, pH 7,6) por 1 h à temperatura ambiente. As proteínas relacionadas ao estudo foram detectadas na membrana de nitrocelulose com anticorpos primários anti-BiP/GRP78, (Abcam, cat # Ab32618, Coelho), anti-XBP1s (Biolegend, cat # 619502, Coelho), anti-CHOP (Santa Cruz, cat # sc-575, Coelho), anti-α-tubulina (Santa Cruz, cat # sc–8035, Camundongo) e anti-β-actina (Sigma, cat # A5441, Camundongo), todos diluídos 1:1000 em solução de soro albumina bovina - BSA 5%) por incubação de 14-16 h à 4° C. Posteriormente, estas membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário policlonal Cabra anti-IgG de coelho acoplado a HRP (BioRad, cat # 170 5046) e Coelho anti-IgG de camundongo acoplado a HRP, (BioRad, cat # 170 5047), diluição 1:1000 em TBS-T com 5% de leite desnatado, por 1 h à temperatura ambiente. Ao final, os resultados foram obtidos pela exposição das membranas aos reagentes de quimioluminescência e visualizados em fotodocumentador (ImageQuant LAS 4000 - GE). A intensidade e quantificação das bandas foi realizada por densitometria (ImageQuant TL- GE), sendo os valores normalizados pelos valores de densitometria dos controles internos (α-tubulina e β-actina).

3.7 Análise do potencial de membrana mitocondrial

Células NIH-3T3 foram cultivadas por 2 dias nas condições descritas no item 3.4 e posteriormente semeadas (2,3 x 10^4) em placas de 35 mm com fundo de vidro (Maktek). Após 3 horas de adesão, Tapsigargina 1 μM foi adicionada somente às células cultivadas para avaliação do controle positivo e mantidas por 24 horas nesta condição. Após este período (3º dia), células dos três grupos experimentais (controle CT- 5 mM glicose, elevada concentração se glicose - 30 mM glicose e controle positivo TG – 5 mM glicose) foram marcadas *in vivo* para análise do potencial de membrana das mitocôndrias, utilizando marcador fluorescente JC-1 (Molecular Probes®) na concentração de ~0,5 mM (2,5 μg/ml), conforme instruções do fabricante. Trata-se de uma sonda catiônica que exibe um acúmulo mitocondrial dependente de potencial de membrana, que emite fluorescência do verde (~525 nm) ao vermelho (~590 nm). A despolarização mitocondrial é indicada pela redução do sinal vermelho em relação ao verde. A razão de sinal verde/vermelho é dependente apenas do potencial de membrana e não de outros fatores como tamanho, formato e

densidade de mitocôndrias. As células foram incubadas em condições de cultura por 30 minutos em meio contendo JC-1. Após os respectivos períodos, as marcações foram analisadas em microscópio confocal Zeiss LSM 780, com objetiva alpha-plan Apochromat 100 x/1.46 imersão óleo e em sistema de incubação com controle de atmosfera e temperatura, no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP) da USP.

3.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando os programas Excel e GraphPad Prisma (versão 5.0). O teste t de Student foi empregado para análises de apenas duas populações e Análise de Variância one-way (ANOVA) com pós-teste de Tukey para mais de duas populações. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da elevada concentração de glicose sobre a morfologia de fibroblastos NIH-3T3

Como pode ser observado na Figura 1, a análise por microscopia eletrônica de transmissão das células NIH-3T3 expostas à elevada concentração de glicose por 3 dias mostrou que essas células apresentaram expansão do RE com uma dilatação das cisternas, quando comparadas às células controle, cultivadas em uma concentração fisiológica de glicose.

Também observamos que um grande número de células NIH-3T3 expostas à alta concentração de glicose apresentou alterações na morfologia das mitocôndrias, enquanto em outras células do mesmo cultivo estas alterações não foram observadas (Figura 1). A preservação mitocondrial na amostra sugere que o protocolo de fixação foi adequado; o fato das células controle apresentarem mitocôndrias preservadas é uma segunda confirmação, já que o processamento foi realizado paralelamente. Outra alteração observada foi um aumento no número de vacúolos intracelulares com conteúdo desconhecido nas células NIH-3T3 expostas à elevada concentração de glicose (não mostrado).

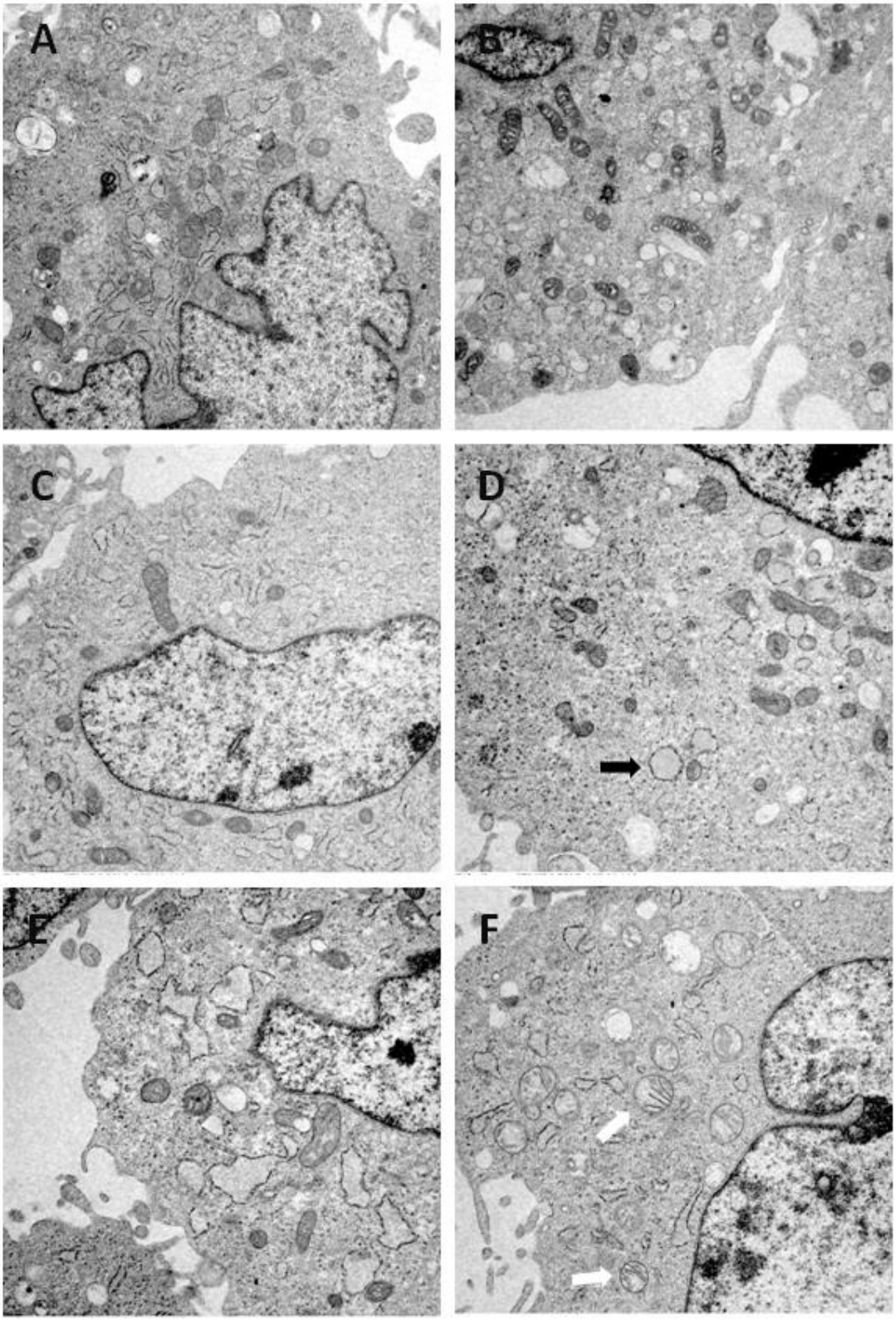

Figura 1 - Efeitos da glicose elevada na morfologia de fibroblastos NIH-3T3. Células NIH-3T3 foram expostas a concentrações fisiológicas (A-C) ou elevadas (D-F) de glicose por três dias. A morfologia celular foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão. Setas pretas apontam o RER expandido e setas brancas apontam mitocôndria com morfologia alterada.

4.2 Efeitos da elevada concentração de glicose sobre a expressão de proteínas da UPR

Com base nas alterações morfológicas descritas acima, decidimos investigar se a concentração alta de glicose poderia estar ativando a UPR nessas células. Para isso, analisamos a expressão de três proteínas que são ativadas durante a UPR: XBP1s, CHOP e a chaperona BiP. Estes experimentos foram realizados tanto em células NIH-3T3 como em culturas primárias de fibroblastos provenientes de ratos controle e diabéticos.

Células NIH-3T3 apresentaram expressão basal de XBP1s, a qual não foi alterada em células expostas à concentração elevada de glicose (Figura 2). A capacidade dessas células em ativar a UPR, no entanto, foi confirmada pela exposição a Tapsigargina (TG), um indutor de estresse do RE, que aumentou a expressão de XBP1s (Figura 2). Em fibroblastos dérmicos derivados de animais controle e diabéticos não foi possível identificar a expressão da proteína XBP1s (resultados não apresentados).

A expressão da proteína CHOP/GAD153, que pode ser ativada pelos 3 braços da UPR (IRE1, ATF6 e PERK), não foi modulada pela variação da concentração de glicose em células NIH-3T3, mas foi induzida nessas células por tapsigargina (TG) (Figura 3). Um resultado semelhante foi observado em fibroblastos dérmicos derivados de ratos controle e diabéticos, sendo que a expressão de CHOP foi induzida somente pelo tratamento com TG (Figura 4).

A expressão da proteína BiP não foi alterada pela variação na concentração de glicose em células NIH-3T3, embora as células tenham respondido positivamente à Tapsigargina, aumentando sua expressão (Figura 5). No entanto, fibroblastos dérmicos derivados de ratos diabéticos mostraram uma redução da expressão dessa chaperona quando comparados a fibroblastos derivados de animais controle (Figura 6). Conforme esperado, um aumento dos níveis de BiP/GRP78 foram observados quando essas células foram tratadas com tapsigargina.

A sonda fluorescente JC-1, que indica o potencial de membrana mitocondrial, apresentou marcação similar em células NIH-3T3 expostas a concentrações fisiológica ou elevada de glicose durante 3 dias (Figura 7). A razão verde/vermelho

aumentada seria compatível com alterações mitocondriais relacionadas à despolarização da membrana.

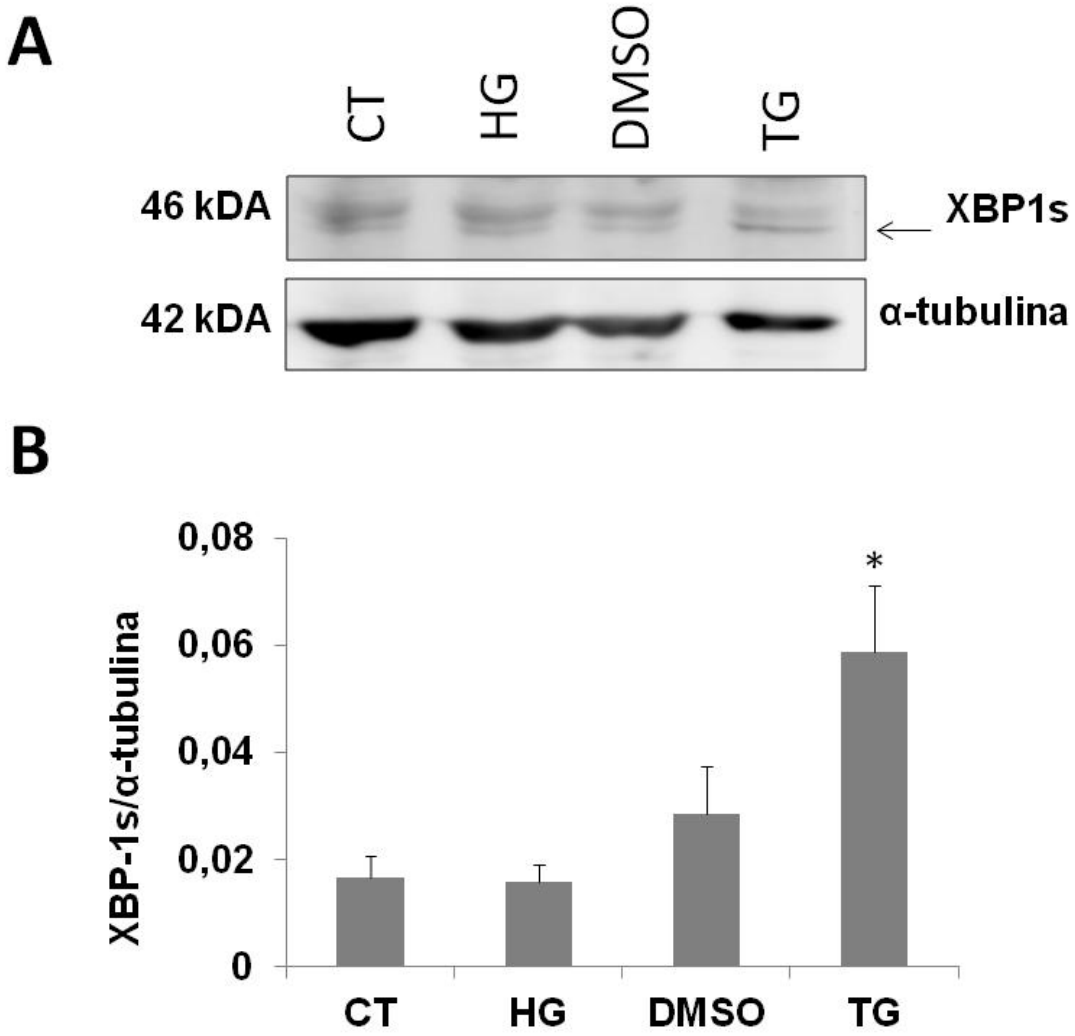

Figura 2 - O *splicing* alternativo de XBP1 não é modulado pela glicose em células NIH-3T3. Células NIH-3T3 foram expostas a concentrações fisiológicas (CT) ou elevadas (HG) de glicose por três dias ou a tapsigargina (TG) ou DMSO (veículo da TG) por 24 h. O lisado celular foi utilizado em ensaios de western blotting para avaliar XBP-1s e α-tubulina (utilizada para controle da quantidade de proteína aplicada ao gel). A. figura representativa de 4 experimentos independentes e B. quantificação dos resultados por densitometria, apresentado como média + SE. * $P < 0,05$ por teste t pareado contra o seu respectivo controle.

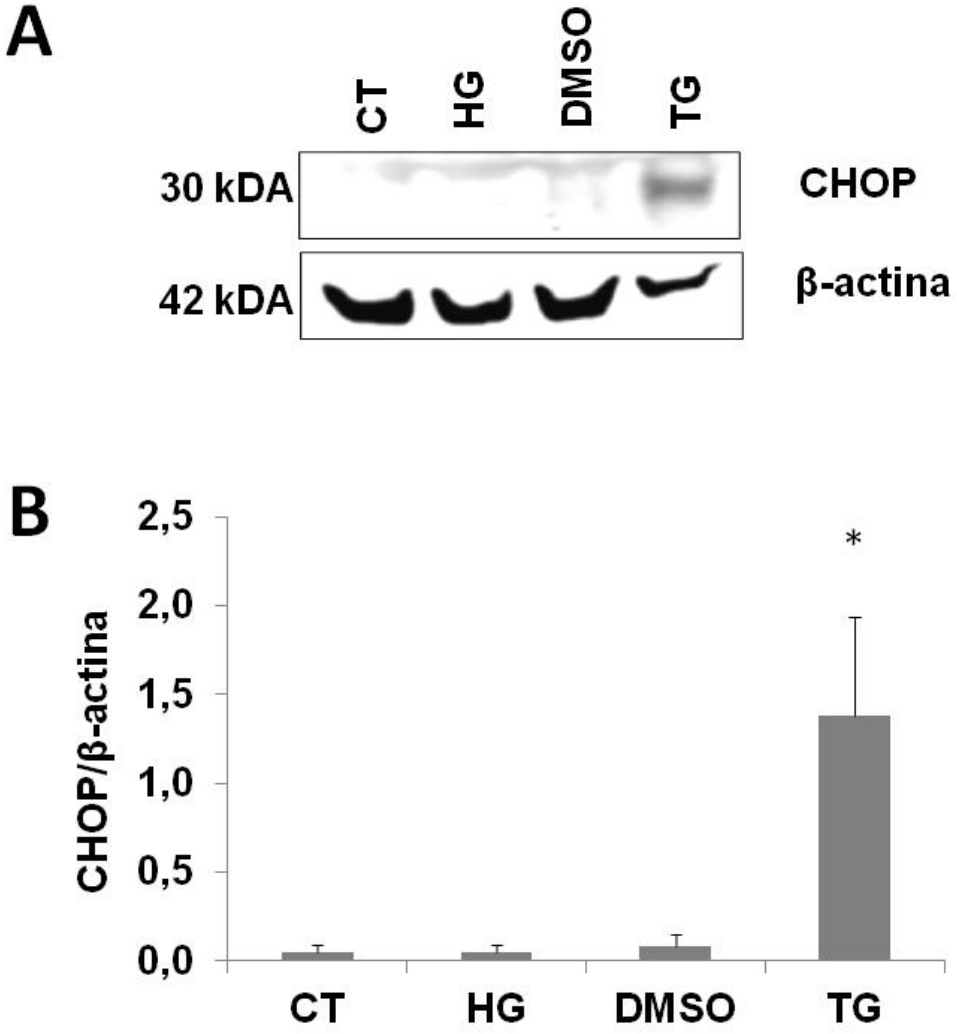

Figura 3 - A expressão de CHOP não é induzida pela glicose elevada em células NIH-3T3. Células NIH-3T3 foram expostas a concentrações fisiológicas (CT) ou elevadas (HG) de glicose por três dias ou a tapsigargina (TG) ou DMSO (veículo) por 24 h. O lisado celular foi utilizado em ensaios de western blotting para avaliar CHOP e β-actina (utilizada para controle da quantidade de proteína aplicada ao gel). A. figura representativa de 4 experimentos independentes e B. quantificação dos resultados apresentada como média + SE. * $P < 0,05$ por teste t pareado contra o seu respectivo controle.

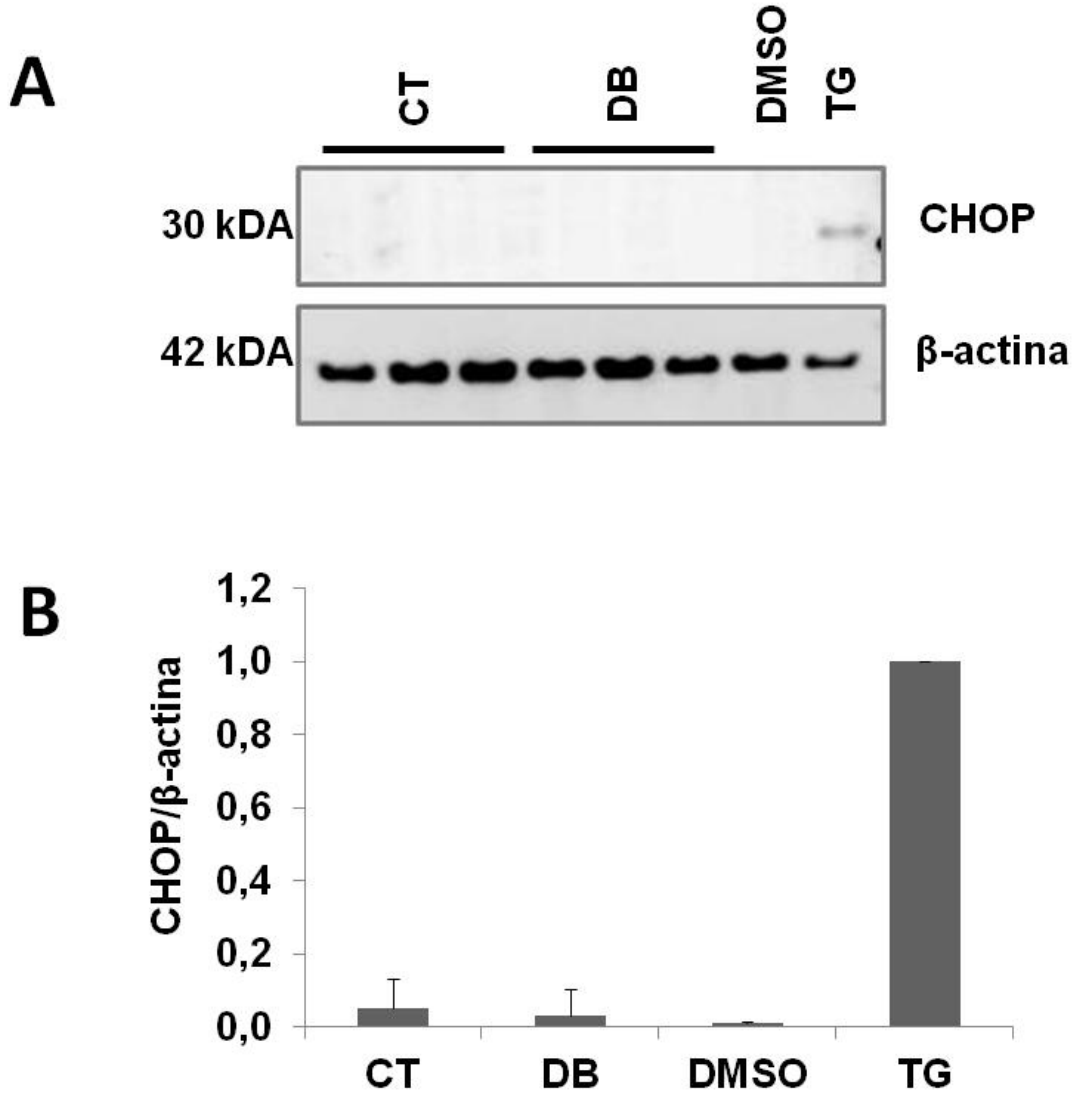

Figura 4 - O diabetes mellitus não altera a expressão de CHOP em fibroblastos dérmicos. Fibroblastos da derme obtidos de ratos controle (CT) ou diabéticos (DB) foram cultivados em concentrações fisiológicas (CT) ou elevadas (DB) de glicose ou expostos a tapsigargina (TG) ou DMSO (veículo) por 24 h. O lisado celular foi utilizado em ensaios de western blotting para avaliar CHOP e β-actina (utilizada para controle da quantidade de proteína aplicada ao gel). A. figura representativa de 2-6 experimentos independentes e B. quantificação dos resultados mostrado como média + SE. * $P < 0,05$ por teste t pareado contra o seu respectivo controle.

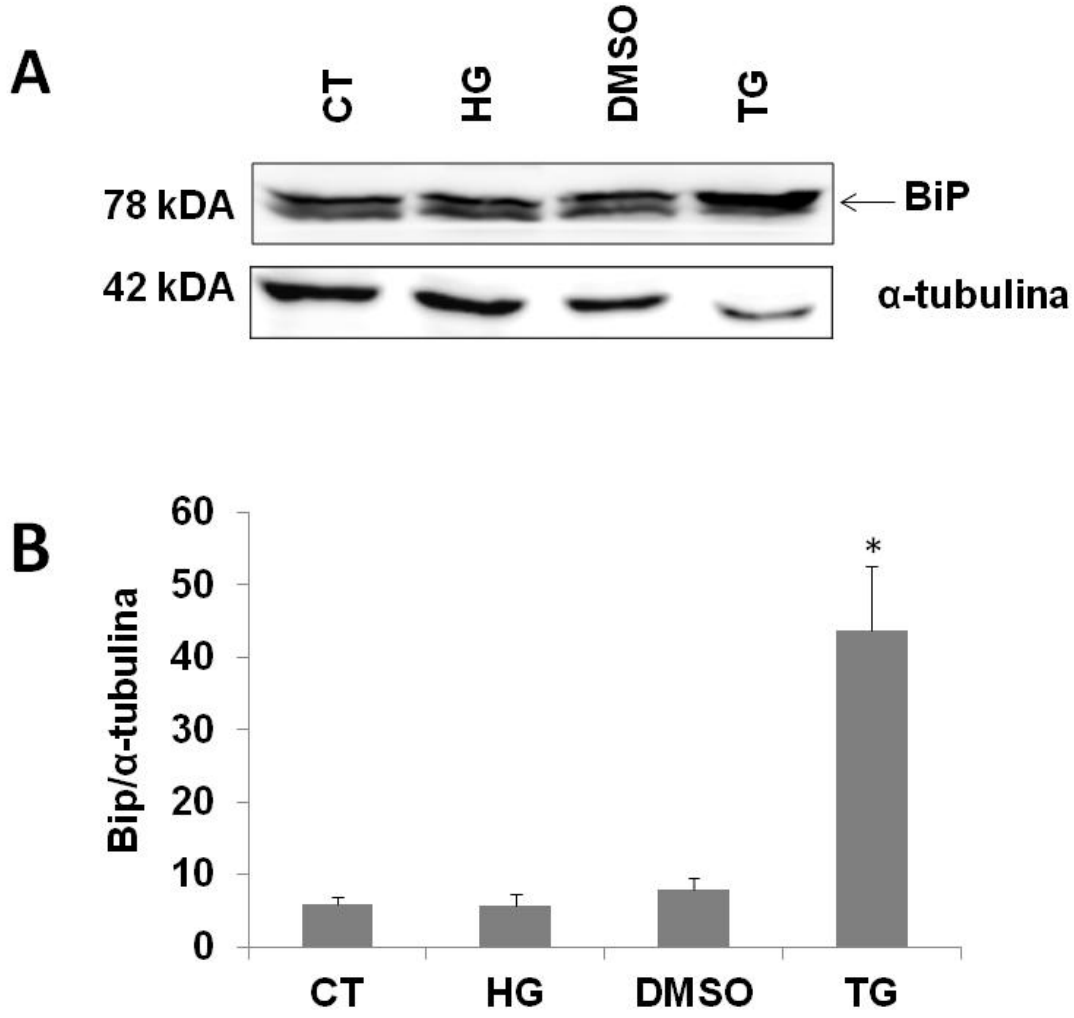

Figura 5 - A expressão de BIP/GRP78 não é modulada pela glicose elevada em células NIH-3T3. Células NIH-3T3 foram expostas a concentrações fisiológicas (CT) ou elevadas (HG) de glicose por três dias ou a tapsigargina (TG) ou DMSO (veículo) por 24 h. O lisado celular foi utilizado em ensaios de western blotting para avaliar BiP e α-tubulina (utilizada para controle da quantidade de proteína aplicada ao gel). A. figura representativa de 4 experimentos independentes e B. quantificação dos resultados apresentada como média ± SE. * $P \leq 0,05$ por teste t pareado contra o seu respectivo controle.

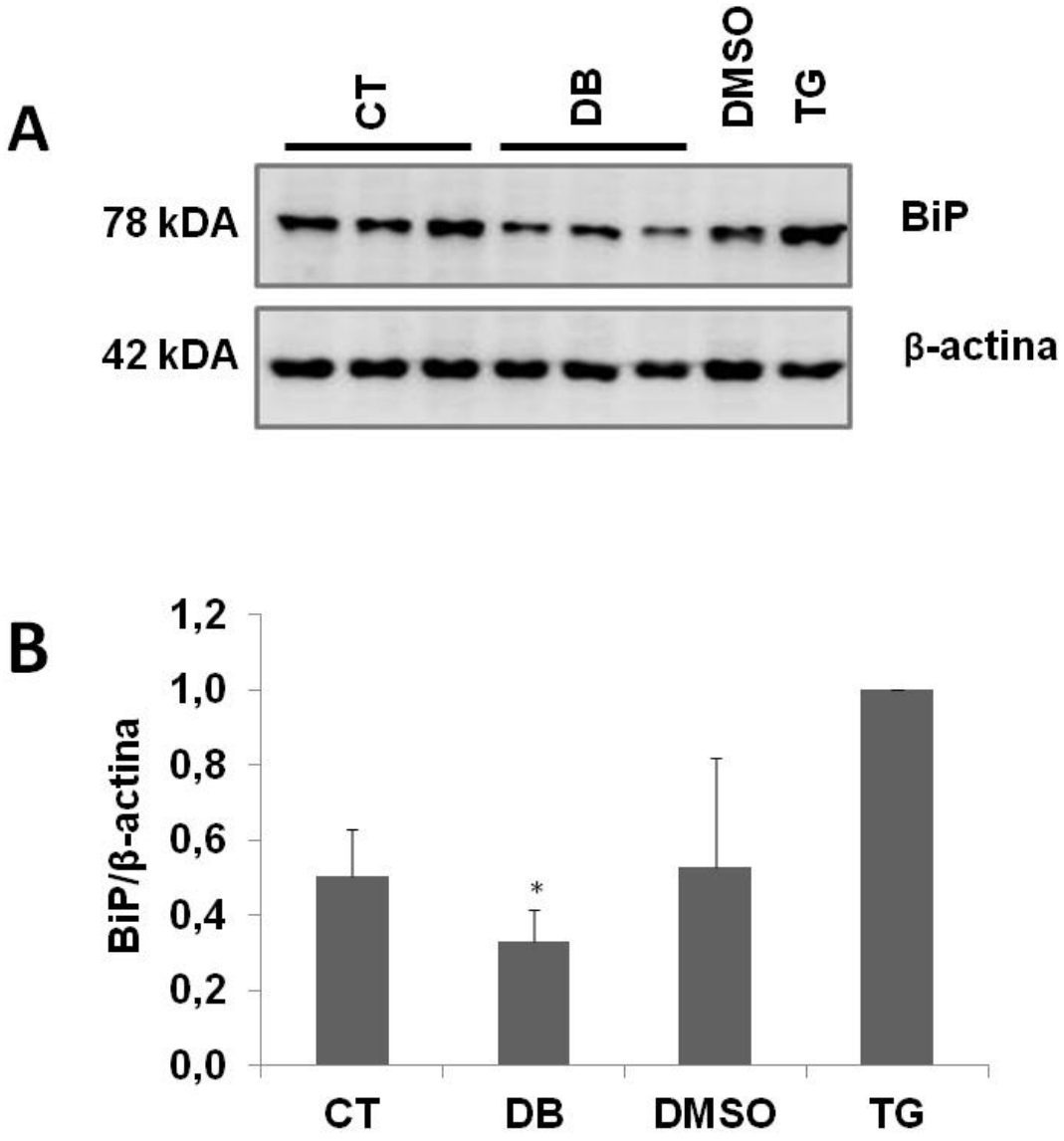

Figura 6 - Hiperglicemia diminui a expressão de BIP/GRP78 em cultura primária de fibroblastos de rato. Fibroblastos da derme obtidos de ratos controle (CT) ou diabéticos (DB) foram cultivados em concentrações fisiológicas (CT) ou elevadas (DB) de glicose ou expostos a tapsigargina (TG) ou DMSO (veículo) por 24 h. O lisado celular foi utilizado em ensaios de western blotting para avaliar BiP e β-actina (utilizada para controle da quantidade de proteína aplicada ao gel). **A.** figura representativa de 2-6 experimentos independentes e **B.** quantificação dos resultados apresentada como média $\pm$ SE. * $P \leq 0,05$ por teste t pareado contra o seu respectivo controle.

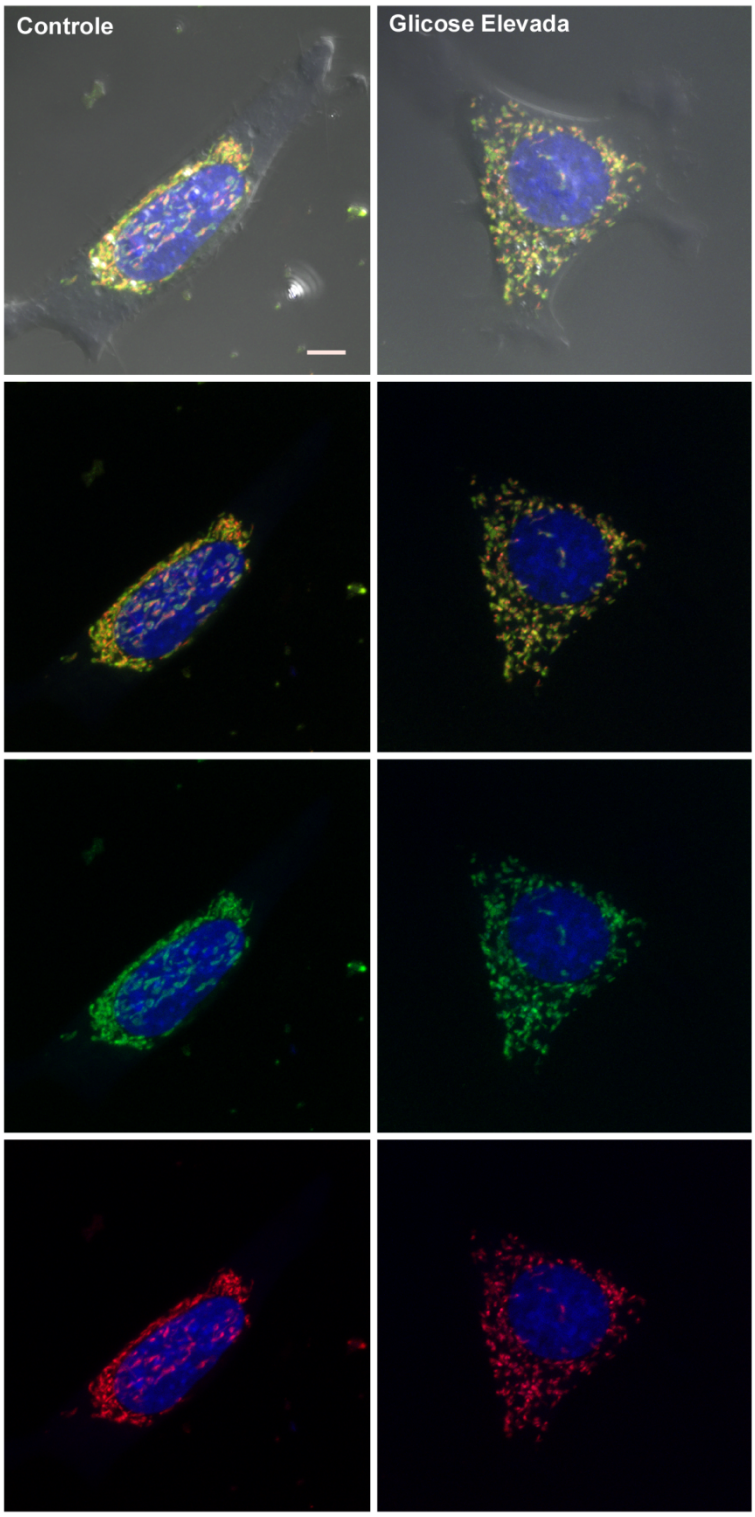

Figura 7 - Alta concentração de glicose não altera significativamente o potencial de membrana mitocondrial. Células NIH-3T3 foram expostas a concentrações fisiológicas ou elevadas de glicose por três dias. As células vivas foram incubadas com a sonda JC-1 por 30 minutos e foram analisadas por microscopia confocal a laser sob temperatura e atmosfera controlados. Os sinais verde e vermelho são mostrados separadamente ou em conjunto. Barra = 5 µm.

5 DISCUSSÃO

Células NIH-3T3 expostas por 3 dias à elevada concentração de glicose apresentaram expansão do RE com dilatação das cisternas, como observado por microscopia eletrônica de transmissão. Alterações similares já haviam sido observadas em fibroblastos dérmicos derivados de ratos diabéticos (ALMEIDA, 2011). Essa observação é importante e mostra características em comum entre fibroblastos expostos à elevada glicose *in vitro* por um curto período de tempo e fibroblastos derivados de ratos diabéticos, com 30 dias de DM.

Alterações morfológicas similares foram previamente relatadas em leveduras sofrendo estresse do RE (SCHUCK et al., 2009). O RE é um grande e contínuo sistema de membranas, responsável pelo enovelamento de proteínas que entram na via secretória e um importante sítio de biossíntese de lipídios de membrana. O tamanho e o formato do RE podem mudar drasticamente (BORGESE; FRANCOLINI; SNAPP, 2006; FEDOROVITCH; RON; HAMPTON, 2005). O estresse do RE, em qualquer tipo celular, aumenta a carga de proteínas no lúmen do RE que serão enoveladas corretamente ou degradadas; um RE maior é necessário nessas circunstâncias, para acomodar essa maior quantidade de proteínas. Além disso, a expansão do RE ocorre concomitantemente à ativação de genes da UPR e aumento da quantidade de chaperonas (RON; WALTER, 2007).

Nós também observamos que as mitocôndrias de células expostas à glicose elevada por 3 dias apresentaram alterações em sua morfologia, com aspecto similar ao fenômeno denominado "*mitochondrial swelling"* (DARIOS, 2003). Esse fenômeno está geralmente relacionado à perda da permeabilidade da membrana mitocondrial, levando à sua disfunção. Esse processo poderia estar relacionado, por exemplo, a um prejuízo na regulação de Ca^{2+} entre o RE e mitocôndria (DENIAUD et al., 2008). A relação entre estresse de RE e disfunção mitocondrial está, com frequência, intimamente ligada à indução de apoptose (GURZOV; EIZIRIK, 2011). Em nosso modelo, porém, apesar de observarmos a alteração morfológica nas mitocôndrias, não observamos uma redução na viabilidade das células NIH-3T3 expostas por 3 dias à elevada glicose (dado não apresentado). Alterações morfológicas similares às observadas por nós foram também descritas em células com ativação da UPR (HOYER-HANSEN;JAATELA, 2007; KARASKOV et al., 2006; SCHUCK et al., 2009; SRIBURI et al., 2004).

Estes resultados diferem daqueles observados previamente por nós em fibroblastos dérmicos derivados de ratos diabéticos (30 dias de DM) (ALMEIDA, 2011). Naquele estudo observou-se um aumento do número de mitocôndrias, que apresentavam aspecto normal. Uma possibilidade que poderia explicar a discrepância entre os dois modelos experimentais é o tempo de exposição à glicose elevada. Enquanto uma exposição aguda (3 dias) ocasionaria o "*mitocondrial swelling",* uma exposição crônica (30 dias) permitiria uma adaptação das células ao metabolismo aumentado da glicose, gerando um aumento do número de mitocôndrias e, consequentemente, maior eficiência da função mitocondrial.

Em condições de exposição aguda à glicose, no entanto, apesar do aspecto observado nas mitocôndrias, o indicador de potencial de membrana mitocondrial JC-1 não mostrou diferenças significativas entre células expostas às concentrações fisiológica ou suprafisiológica de glicose. Esperava-se, talvez, um aumento da fração de sinal verde/vermelho em células que apresentavam mitocôndrias alteradas. Embora a análise por microscopia confocal tenha sido qualitativa e não quantitativa, as fotomicrografias apresentadas sugerem similaridade de sinais. Este resultado sugere a possibilidade de que as alterações na morfologia mitocondrial possam estar associadas a uma adaptação às condições ambientais e que sejam transitórias, não induzindo a morte celular por apoptose. Esta hipótese é reforçada pela ausência de diferenças na viabilidade celular entre células expostas às duas concentrações de glicose.

Para investigar a hipótese de que células expostas à glicose elevada apresentavam ativação da via UPR, analisamos a expressão de diferentes marcadores desta via por western blotting: XBP1s, CHOP e BIP. Células controle apresentaram expressão basal de XBP1s e esta expressão não foi alterada pela exposição à glicose elevada. A capacidade dessas células em ativar a UPR, no entanto, foi confirmada com o uso de Tapsinagina, um indutor de estresse do RE. Em fibroblastos dérmicos de animais controle ou diabéticos não foi possível observar uma expressão basal ou estimulada de XBP1s (mesmo na presença de Tapsigargina). Sabe-se que XBP1s é necessária e suficiente para promover uma expansão do RE, sendo importante para o funcionamento e desenvolvimento desta organela (SHAFFER et al., 2004; SRIBURI et al., 2004). Em células secretoras, como os fibroblastos, que naturalmente possuem grande demanda funcional sobre o RE, uma expressão basal de XBP1s estaria justificada, pela necessidade de rápida

síntese e enovelamento proteico (LEE et al., 2005; REIMOLD et al., 2001; SRIBURI et al., 2004). De fato, o *knockdown* para XBP1s em fibroblastos diminuiu a capacidade de adaptação destas células a situações de estresse e modulou a expansão do RE em resposta à alta demanda de secreção proteica (SRIBURI et al., 2004, 2007).

A indução da UPR durante o estresse do RE pode envolver simultaneamente os três braços da via, ou seja, PERK, IRE1 e ATF6 (KAUFMAN, 1999; RON; WALTER, 2007). Alternativamente, a ativação pode ocorrer parcialmente, dependendo do estímulo ou tipo celular (CARDOZO et al.,2005; GORMAN et al., 2012). A não alteração da expressão de XBP1s nos levou ao estudo da expressão de CHOP em células expostas à glicose excessiva. Esta proteína é induzida por elevada concentração de glicose em células β pancreáticas, por exemplo (BROCA et al., 2014) e também em podócitos (CAO et al., 2014). Em nosso modelo, porém, não observamos indução de CHOP, a não ser quando as células (NIH-3T3 ou fibroblastos dérmicos) foram tratadas com Tapsigargina. A expressão de CHOP é normalmente observada quando as células não são capazes de recuperar a homeostase do RE ou se adaptar às condições que levam à ativação da UPR, ocorrendo então a indução de apoptose (RAO; BREDESEN, 2004; RON; WALTER, 2007). A apoptose, por sua vez, é considerada um importante mecanismo para a homeostase de diferentes organismos, eliminando células que não são capazes de funcionar corretamente. Em nosso modelo experimental, a exposição à elevada concentração de glicose leva a disfunções celulares como defeitos na migração, mas não altera o índice de morte celular. Essa proteção poderia estar associada a um mecanismo pelo qual a célula, mesmo sofrendo estresse que leva à sua disfunção, não apresenta a indução de mecanismos que levem à sua apoptose. É preciso considerar que as células tratadas com um bloqueador irreversível da bomba de Ca^{2+} e indutor de estresse, Tapigargina, apresentaram indução de CHOP e sofreram aumento de morte celular (resultados não apresentados).

Outra proteína que é induzida pelos 3 braços da UPR é a chaperona BiP/GRP78 (RON; WALTER, 2007). A chaperona BiP é extremamente importante para o enovelamento apropriado no RE e controle de qualidade das proteínas que vão para as vias secretórias. Tal qual os resultados obtidos para XPB1s, em células NIH-3T3 expostas à elevada concentração de glicose, não foram observadas alterações na expressão de BiP. Fibroblastos dérmicos derivados de ratos

diabéticos, por outro lado, apresentaram uma diminuição na expressão de BiP quando comparados a fibroblastos de animais controle. Em podócitos foi mostrado que um aumento da expressão de BiP pode ocorrer em 12 e 24 horas após a exposição à elevada concentração de glicose, mas esses níveis diminuíram em 72 horas (CAO et al., 2014). Em nosso modelo com células NIH-3T3 não foram verificadas exposições com tempo inferior a 70 horas (3 dias), portanto, não é possível afirmar se as células realmente não induziram BiP ou se isso já ocorreu em períodos precoces. Considerando que BiP é um importante modulador da UPR (RON ;WALTER, 2007), sua diminuição em fibroblastos dérmicos pode refletir uma adaptação destas células ao estado diabético.

Em conjunto, esses resultados sugerem que fibroblastos expostos à elevada concentração de glicose agudamente (3 dias) ou cronicamente (30 dias) não apresentam sinais de ativação da via UPR no período avaliado, embora várias funções celulares como migração celular e adesão à MEC estejam prejudicadas (ALMEIDA, 2011; LAMERS et al., 2011). É possível que o estímulo avaliado (glicose elevada) não seja suficiente para esta ativação, ou que a ativação seja incompleta, ao contrário do que foi observado com o estímulo Tapsigargina. O fato das células exibirem um aumento no tamanho do RE, bem como um aumento da vacuolização em resposta à elevada concentração de glicose extracelular (ALMEIDA, 2011), nos sugere que essas alterações podem não estar associadas à UPR. Interessantemente, em leveduras, foi mostrado que a expansão de membranas do RE pode aliviar o estresse do RE, independentemente de um aumento dos níveis de chaperonas, havendo um desacoplamento entre o tamanho do RE e a ativação da UPR. Assim, o aumento do volume do RE através da biossíntese de membranas lipídicas é uma parte distinta de um programa para superar o estresse do RE. Essa observação aponta para o papel da expansão de membranas também durante a UPR, quando o tamanho do RE e os níveis de chaperonas aumentam simultaneamente, promovendo maior espaço luminal para acomodar novas proteínas para o maquinário de enovelamento. Um RE expandido pode tolerar mais proteínas mal enoveladas antes da perda de função, ou promovendo o seu enovelamento apropriado. Além disso, o volume do RE durante o enovelamento diminui a concentração de proteínas mal enoveladas, reduzindo a possibilidade da formação de agregados proteicos (APETRI; HORWICH, 2008).

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados mostram que a exposição de fibroblastos à glicose elevada no meio extracelular em dois modelos experimentais (fibroblastos de linhagem murina expostos agudamente à glicose e fibroblastos dérmicos de animais diabéticos) apresentam alterações morfológicas similares no retículo endoplasmático, como dilatação das cisternas. Por outro lado, a morfologia mitocondrial é diferente, embora alterações funcionais não tenham sido observadas. Os resultados também sugerem que a glicose elevada não induziu a ativação da via UPR em relação às proteínas (XBP1s, CHOP e BiP) e ao período avaliado. É possível que as alterações morfológicas intracelulares observadas estejam relacionadas a uma adaptação destas células ao ambiente hiperglicêmico, com função protetora.

REFERÊNCIAS*

AGOSTINIS, P.; SAMALI, A. **Endoplasmic Reticulum Stress in Health and Disease**. New York**: Springer**, 2012. (DOI 10.1007/978-94-007-4351-9)

AGUIAR GKLD, VILLELA NR e BOUSKELA Eliete. A Micro circulação no Diabetes: Implicações nas Complicações Crônicas e Tratamento da Doença. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v.51, n.2, p. 204-211, Jan 2007.

ALIKHANI, M. et al. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. **Bone**, v. 40, n. 2, p. 345–353, fev. 2007.

ALIKHANI, Z. et al. Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12087–12095, 1 abr. 2005.

ALMEIDA et al., em preparação.

ALMEIDA MES. **Hiperglicemia e interação fibroblasto-matriz extracelular-influencias na adesão e migração em substratos bidimensional e tridimensional**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

APETRI, A. C,; HORWICH, A. L. Chaperonin chamber accelerates protein folding through passive action of preventing aggregation. **Proceedings os the National Academy of Sciences of the United of America**, v. 105, n. 45, p. 17351-17355, 11 nov.2008.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BACK, S. H.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. **Annual review of biochemistry**, v. 81, p. 767–793, jan. 2012.

BAEK, H. A. et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in myofibroblastic differentiation of lung fibroblasts. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 46, n. 6, p. 731–739, jun. 2012.

BERNALES, S.; MCDONALD, K. L.; WALTER, P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. **PLoS biology**, v. 4, n. 12, p. e423, nov. 2006.

BERRIDGE, M. J. The endoplasmic reticulum : a multifunctional signaling organelle. **Cell** calcium, v. 32, p. 235–249, 2002.

BOMMIASAMY, H. et al. ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. **Journal of cell science**, v. 122, n. Pt 10, p. 1626–36, 15 maio 2009.

BOOT-HANDFORD, R. P.; BRIGGS, M. D. The unfolded protein response and its relevance to connective tissue diseases. **Cell and tissue research**, v. 339, n. 1, p. 197-211, jan. 2010.

BORGESE, N. FRANCOLINI, M. SNAPP, E. Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux. **Current opinion in cell biology**, v. 18, n. 4, p. 358-364, ago. 2006

BROCA, C. et al. Proteasome dysfunction mediates high glucose-induced apoptosis in rodent beta cells and human islets. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92066, jan. 2014.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-820, 2001

CAO, Y. et al. Role of endoplasmic reticulum stress in apoptosis of differentiated mouse podocytes induced by high glucose. **International journal of molecular medicine**, v. 33, n. 4, p. 809–816, abr. 2014.

CARDOZO, A. K. et al. Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca^{2+} ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca^{2+}, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic β-Cells. **American diabetes association**, v. 134, n. 3, p. 306–316, jun 2012

CHAMBERS, J. E.; MARCINIAK, S. J. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 2. Protein misfolding and ER stress. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 307, n. 8, p. C657–C670, 15 out. 2014.

CHARLES, R. L.; EATON, P. Redox signalling in cardiovascular disease. **Proteomics. Clinical applications**, v. 2, n. 6, p. 823–836, jun. 2008.

CHEN, Y.; BRANDIZZI, F. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. **Trends in cell biology**, v. 23, n. 11, p. 547–555, nov. 2013.

CHOW, S.-E. et al. Resveratrol induced ER expansion and ER caspase-mediated apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 19, n. 3, p. 527–541, mar. 2014.

CNOP, M. et al. Causes and cures for endoplasmic reticulum stress in lipotoxic β-cell dysfunction. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 12 Suppl 2, p. 76–82, out. 2010.

DARIOS, F. Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. **Human molecular genetics**, v. 12, n. 5, p. 517–526, 1 mar. 2003.

DENIAUD, A et al. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. **Oncogene**, v. 27, n. 3, p. 285–299, 10 jan. 2008.

FEDEROVITCH, C. M.; RON, D.; HAMPTON, R. Y. The dynamic ER: experimental approaches and current questions. **Current opinion in cell biology**, v. 17, n. 4, p. 409–414, ago. 2005.

GOH, S.-Y.; COOPER, M. E. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. **The journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 93, n. 4, p. 1143–1152, abr. 2008.

GORMAN, A. M. et al. Stress managment at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. **Pharmacology and therapeutics**, v. 134, n. 45, p. 306-316, jun. 2012

GROENENDYK, J.; MICHALAK, M. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. **Acta biochimica polonica**, v. 52, n. 2, p. 381-395, jan. 2005.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 15, p. 314-321

GURZOV, E. N.; EIZIRIK, D. L. Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of β-cell death and dysfunction. **Trends in cell biology**, v. 21, n. 7, p. 424–431, jul. 2011.

HALLIWELL B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of** Nutrition, v. 16, p. 33-50, nov 1996.

HAYNES, C. M.; TITUS, E. A; COOPER, A. A. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. **Molecular cell**, v. 15, n. 5, p. 767–776, 10 set. 2004.

HØYER-HANSEN, M.; JÄÄTTELÄ, M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. **Cell death and differentiation**, v. 14, n. 9, p. 1576–1582, set. 2007.

INAGI, R. **Endoplasmic reticulum: the master regulator of stress responses in glomerular diseases**. [s.l: s.n.]. 2011.

JOHANSEN JS, HARRIS KA , RYCHLY JD e ERGUL A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular diabetology**, v. 4 p. 5, abr 2005.

KARASKOV, E. et al. Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. **Endocrinology**, v. 147, n. 7, p. 3398–3407, jul. 2006.

KARBACH, S. et al. Hyperglycemia and oxidative stress in cultured endothelial cells--a comparison of primary endothelial cells with an immortalized endothelial cell line. **Journal of diabetes and its complications**, v. 26, n. 3, p. 155–162, 2012.

KAUFMAN, R. J. coordination of gene transcriptional and translational controls Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum : coordination of gene transcriptional and translational controls. v. 13, p. 1211-1233, 1999.

KIM, I.; XU, W.; REED, J. C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nature reviews**. Drug discovery, v. 7, n. 12, p. 1013-1030, dez. 2008.

LAKSHMANAN, A. P. et al. The hyperglycemia stimulated myocardial endoplasmic reticulum (ER) stress contributes to diabetic cardiomyopathy in the transgenic non-obese type 2 diabetic rats: a differential role of unfolded protein response (UPR) signaling proteins. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 2, p. 438–447, fev. 2013.

LAMERS LM, ALMEIDA ESM, VICENTE-MANZANARES, HORWITZ F A e SANTOS FM. High glucose- mediated oxidative stress impars cell migration. **Plos one**, 6(8) e 22865, agosto 2011.

LEE, A.-H. et al. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. **The EMBO journal**, v. 24, n. 24, p. 4368–4380, 21 dez. 2005.

LERMAN, O. Z. et al. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration,vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. **American journal of pathology**, v**.** 12, n. 1, p. 303-312, jan. 2003.

LOOTS, M. A. et al. Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation. **Archives of dermatological Research**, v. 291, n 2-3, p. 93-99, mar. 1999.

LOOTS, M. A. et al. Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls. **European journal of cell biolology**, v. 81, n. 3, p. 153-160, mar. 2002.

LOUGHLIN, D. T.; ARTLETT, C. M. Precursor of advanced glycation end products mediates ER-stress-induced caspase-3 activation of human dermal fibroblasts through NAD(P)H oxidase 4. **PloS one**, v. 5, n. 6, p. e11093, jan. 2010.

MARCINIAK, S. J. et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. **Genes and development**, v. 18,n. 24, p. 3066–3077, dez. 2004.

MARTIN P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 276-275, abril 1997.

MONTEIRO, K. S. efeitos da elevada concentração de glicose sobre a reciclagem de integrinas contendo a subunidade β1 em fibroblastos. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014

MOORADIAN, A. D.; HAAS, M. J. Glucose-induced endoplasmic reticulum stress is independent of oxidative stress: A mechanistic explanation for the failure of antioxidant therapy in diabetes. **Free radical biology & medicine**, v. 50, n. 9, p. 1140–1143, maio. 2011.

OSLOWSKI, C. M.; URANO, F. The binary switch that controls the life and death decisions of ER stressed β cells. **Current opinion in cell biology**, v. 23, n. 2, p. 207–215, abr. 2011.

PACHER, P.; BECKMAN, J.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 315-424, jan.2007.

REIMOLD, A. M. et al. An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. **Genes and development**, v. 14, n. 617, p. 152–157, 2000.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 7, p. 519–529, jul. 1AD.2007.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R. J. The mammalian unfolded protein response. **Annual review of biochemistry**, v. 74, p. 739-789, jan. 2005.

SCHUCK, S. et al. Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. **The journal of cell biology**, v. 187, n. 4, p. 525–536, 16 nov. 2009.

SHAFFER, A L. et al. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. **Immunity**, v. 21, n. 1, p. 81–93, jul. 2004.

SHEIKH-ALI, M. et al. Effects of antioxidants on glucose-induced oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. **Diabetes research and clinical practice**, v. 87, n. 2, p. 161–166, fev. 2010.

SHIBATA, Y. et al. The reticulon and DP1/Yop1p proteins form immobile oligomers in the tubular endoplasmic reticulum. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 27, p. 18892–18904, 4 jul. 2008.

SINGER AJ, CLARK RA Cutaneous wound healing. **The new england journal of medicine**, v. 341, p. 738–746, set. 1999.

SRIBURI, R. et al. Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1(S)-induced endoplasmic reticulum biogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7024–7034, 9 mar. 2007.

SRIBURI, R. et al. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. **The journal of cell biology**, v. 167, n. 1, p. 35–41, 11 out. 2004.

TABAS, I.; RON, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. **Nature cell biology**, v. 13, n. 3, p. 184–190, mar. 2011.

TANAKA, K. et al. Advanced glycation end products suppress osteoblastic differentiation of stromal cells by activating endoplasmic reticulum stress. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 438, n. 3, p. 463–467, 30 ago. 2013.

TANG, C. et al. Glucose-induced beta cell dysfunction in vivo in rats: link between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. **Diabetologia**, v. 55, n. 5, p. 1366–1379, maio 2012.

TANIS, R. M. et al. The effect of glucose concentration and sodium phenylbutyrate treatment on mitochondrial bioenergetics and ER stress in 3T3-L1 adipocytes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1853, n. 1, p. 213–221, jan. 2015.

TSILIBARY, E. C. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. **The Journal of pathology**, v. 200, n. 4, p. 537-546, jul. 2003.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, jan. 2007.

VERKHRATSKY, A. The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signalling. **Cell calcium**, v. 32, p. 393–404, 2002.

VOELTZ, G. K.; ROLLS, M. M.; RAPOPORT, T. A. Structural organization of the endoplasmic reticulum. **EMBO reports**, v. 3, n. 10, p. 944–950, out. 2002.

WALTER, P.; RON, D. The Unfolded Protein Response : PERK. v. 334, n. November, p. 1081–1087, 2011.

WIKSTROM, J. D. et al. AMPK regulates ER morphology and function in stressed pancreatic β-cells via phosphorylation of DRP1. **Molecular endocrinology**, v. 27, n. 10, p. 1706–1723, out. 2013.

WILSON, J. D. **WILLIANS Textbook of endocrinology**. 8. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992. 1712 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/>. Acesso em: 16 jul. 2013

WU, L. et al. Endoplasmic reticulum stress plays a role in the advanced glycation end product-induced inflammatory response in endothelial cells. **Life sciences**, v. 110, n. 1, p. 44–51, 6 ago. 2014.

YOUNCE, C. W.; BURMEISTER, M. A; AYALA, J. E. Exendin-4 attenuates high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress and activation of SERCA2a. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 304, n. 6, p. C508–C518, mar. 2013.