

KELLY SALZMANN MONTEIRO

**EFEITOS DA ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SOBRE A
RECICLAGEM DE INTEGRINAS CONTENDO A SUBUNIDADE β 1 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.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

MONTEIRO, K. S. **Efeitos da elevada concentração de glicose sobre a reciclagem de integrinas contendo $\beta 1$ em fibroblastos.** 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Em condições de hiperglicemia crônica, assim como na exposição *in vitro* de células à concentração elevada de glicose, há uma redução da velocidade e direcionalidade celulares, resultando numa migração deficiente. Em fibroblastos, células muito importantes para a cicatrização, este efeito é acompanhado de uma redução de integrinas ligantes de fibronectina na superfície celular. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão proteica (por western blotting) e distribuição (por imunodeteção) de integrinas contendo a subunidade $\beta 1$ em fibroblastos NIH3T3 expostos à glicose em concentração fisiológica (5 mM) ou elevada (25 mM), tratadas durante 21 dias. As vias envolvendo a endocitose, degradação e reciclagem destas integrinas foram avaliadas por meio da distribuição (por imunocitoquímica) e expressão proteica (por western blotting) dos marcadores EEA1 (endossomos primários), Rab7 (endossomos tardios-degradação), Rab11 (reciclagem lenta) e Rab4 (reciclagem rápida). Foi também avaliada a fibrilogênese de fibronectina por estas células, um fenômeno que envolve a integrina $\alpha 5\beta 1$. Células expostas à alta concentração de glicose apresentaram menor fibrilogênese de fibronectina, menor expressão/distribuição de EEA1 e de Rab11. A expressão de Rab7 não foi afetada, enquanto Rab4 aumentou em cerca de 50%. Os resultados sugerem que a expressão de integrinas contendo $\beta 1$ está reduzida em células expostas à glicose excessiva, o que pode estar associado à menor fibrilogênese da fibronectina. Quanto à endocitose, aparentemente a quantidade de carga internalizada é menor, mas a degradação em vias envolvendo Rab7 não está alterada. A reciclagem pela via lenta envolvendo

Rab11, no entanto, está diminuída, enquanto a via rápida envolvendo Rab4 está aumentada. É possível que estas alterações sejam compensatórias, visando a homeostase das adesões à matriz extracelular.

Palavras-chave: Glicose elevada. GTPases Rab. Fibroblastos. Endocitose. Reciclagem. Integrinas.

ABSTRACT

MONTEIRO, K. S. **Effects of high glucose concentration on the recycling of β 1-containing integrins in fibroblasts.** 2014. 70 p. Master thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Under conditions of chronic hyperglycemia, as well as under *in vitro* exposure of cells to high glucose concentrations, a reduction of cellular speed and directionality is observed, resulting in poor migration. In fibroblasts, very important cells for wound healing, this effect is accompanied by a reduction of fibronectin-binding integrins on the cell surface. The aim of this study was to evaluate the protein expression (by western blotting) and distribution (by immunodetection) of β 1-containing integrins in NIH3T3 fibroblasts exposed to glucose under physiological (5 mM) or high (25 mM) concentrations, treated for 21 days. The pathways involving endocytosis, degradation and recycling of these integrins were assessed by means of the distribution (by immunocytochemistry) and protein expression (by western blotting) of the following markers: EEA1 (primary endosomes), Rab7 (late endosomes-degradation), Rab11 (slow recycling) and Rab4 (fast recycling). We also evaluated the fibronectin fibrillogenesis by these cells, a phenomenon that involves the integrin α 5 β 1. Cells exposed to high glucose showed less fibronectin fibrillogenesis, and lower expression / distribution of EEA1 and Rab11. Expression of Rab7 was not affected, while Rab4 was increased by about 50%. The results suggest that the expression of β 1-containing integrins is reduced in fibroblasts exposed to high glucose, what might be related to the reduced fibronectin fibrillogenesis. As for endocytosis, apparently the amount of internalized load is smaller, but the degradation pathway involving Rab7 is not changed. Recycling by the slow pathway

involving Rab11, however, is reduced while the rapid pathway involving Rab4 is increased. It is possible that these changes are compensatory in order to reach homeostasis of the cellular adhesions to the extracellular matrix.

Keywords: Hyperglycemia. Rab GTPases. Fibroblast. Endocytosis. Recycling. Integrins.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Diabetes mellitus (DM) é, atualmente, um dos principais problemas de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS-2013), esta doença acomete atualmente mais de 340 milhões de pessoas em diversos países, sendo que o Brasil encontra-se entre os dez países com maior incidência. Em 2010, estimou-se aproximadamente 3,4 milhões de óbitos associados a complicações desta doença. Acredita-se ainda que estes números venham a ser duplicados até 2030.

De acordo com a OMS, esta patologia pode ser definida como um grupo de desordens metabólicas que resulta em elevada concentração de glicose circulante (hiperglicemia). Este quadro hiperglicêmico pode ser causado basicamente pela deficiência na produção de insulina, hormônio pancreático importante para a captação de glicose por diversos tecidos (Diabetes tipo I), ou pela resistência tecidual à ação da insulina, ou até mesmo pela secreção alterada deste hormônio (Diabetes tipo II). As alterações na dieta e estilo de vida da população mundial têm aumentado rapidamente a incidência de Diabetes tipo II, frequentemente associado à obesidade. No longo prazo, no entanto, o paciente portador de Diabetes tipo II, devido à excessiva secreção de insulina, pode também apresentar deficiência na secreção deste hormônio.

Independentemente de sua etiologia, a condição hiperglicêmica crônica leva, em longo prazo, a diversas complicações clínicas, principalmente devido ao estresse oxidativo e glicação aleatória de proteínas pelos produtos de glicação avançada (AGEs). Complicações frequentes são a retinopatia, neuropatia, nefropatia, alterações microvasculares e

cicatrização deficiente de feridas, que contribuem para as feridas crônicas, de difícil tratamento.

1.2 Captação e metabolismo da glicose

A glicose (C₆H₁₂O₆) é um dos principais monossacarídeos utilizados como fonte de energia pelos seres vivos, tendo importante papel no metabolismo e homeostase celular, uma vez que é o principal precursor para síntese de ATP. Sua captação ocorre por difusão facilitada, mediada principalmente por uma família de proteínas transmembrana denominadas transportadores de glicose (GLUT). No meio intracelular, a maior parte do metabolismo da glicose ocorre via glicólise. Nesta etapa, um conjunto de reações químicas sucessivas catalisadas por diferentes enzimas citoplasmáticas geram ao final piruvato, ATP e oxida-se o NAD⁺ para NADH, como mostrado na equação geral da glicólise abaixo. Dependendo das condições do ambiente celular (presença ou privação de oxigênio), estes produtos podem ser direcionados para a via anaeróbia (neste caso, fermentação láctica) ou para vias aeróbias (respiração celular – ciclo do ácido cítrico e cadeia respiratória).

Reação Global



Quando o fluxo na via glicolítica está muito aumentado, principalmente se há maior atividade da cadeia respiratória, aumenta também a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Quando superam a capacidade antioxidante celular, estas espécies podem inibir a

atividade de enzimas da via glicolítica, como por exemplo da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O aumento da glicose intracelular combinado à redução do fluxo na via glicolítica ativam vias metabólicas paralelas, como a via das hexosaminas (frutose-6-fosfato gera N-acetilglicosamina como produto final, que modifica vários fatores de transcrição), ativação da proteína cinase C (PKC) e geração de diacilglicerol (DAG) a partir do gliceraldeído-3-fosfato, ativação da via dos polióis e formação de AGEs (BROWNLEE, 2001). De maneira geral, estas vias modificam a transcrição gênica, afetam a função de proteínas por modificações pós-traducionais e aumentam o estresse oxidativo, tanto pelo aumento da geração de EROs quanto pela depleção de algumas defesas antioxidantes.

1.3 Complicações causadas pela hiperglicemia

A condição hiperglicêmica aumenta a captação e metabolismo de glicose por diferentes tipos celulares, o que pode gerar alterações de vias metabólicas, resultando no aumento exacerbado da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Em determinadas condições fisiológicas, as EROs produzidas podem atuar como moléculas sinalizadoras e em mecanismos de defesa, como por exemplo, na fagocitose. No entanto, sua produção excessiva, capaz de superar as defesas antioxidantes das células, promove danos celulares irreversíveis por ser capaz de danificar, direta ou indiretamente, proteínas, lipídeos e DNA (JOHANSEN et al., 2005, revisão).

A produção aumentada de EROs está intimamente relacionada com muitas complicações do Diabetes Mellitus (DM) (HALLWELL, 1996; JOHANSEN et al., 2005; VALKO et al., 2007). Entre as estruturas mais susceptíveis à ação da hiperglicemia estão os vasos sanguíneos. Alterações precoces na microvasculatura promovem aumento da permeabilidade vascular e alterações do fluxo sanguíneo, contribuindo para o surgimento das feridas cutâneas crônicas, principalmente em membros inferiores

(AGUIAR, VILLELA, BOUSKETA, 2007). Estas feridas reduzem significativamente a qualidade de vida dos pacientes e acarretam enormes despesas para o sistema público de saúde. As feridas cutâneas crônicas, no entanto, possuem etiologia multifatorial e ainda pouco esclarecida.

A cicatrização é um processo dinâmico e interativo, que possui etapas sequenciais e coordenadas envolvendo processos como a migração celular, inflamação, angiogênese, proliferação celular, síntese de matriz extracelular (MEC) e remodelamento tecidual, com a finalidade de restaurar a continuidade e arquitetura do órgão lesado. Nestes processos, diferentes tipos celulares estão envolvidos, tais como queratinócitos, células endoteliais e, principalmente, fibroblastos.

Durante o processo cicatricial, fibroblastos do tecido não lesado são ativados e recrutados (GRINELL, 1994). Estas células proliferam e migram para o local da injúria, onde realizam várias funções, dentre elas a síntese, deposição e remodelamento da MEC, síntese de fatores de crescimento e produção de metaloproteinases de matriz (MMPs) - moléculas imprescindíveis para a migração celular e remodelação do tecido durante a cicatrização. Também podem se diferenciar em miofibroblastos, que contribuem para a contração da ferida.

No DM, a cicatrização deficiente é decorrente da alteração de diversos processos já mencionados, como por exemplo, uma diminuição da angiogênese (FALANGA, 2005), alteração da produção de fatores de crescimento, da resposta imunológica e inflamatória (BRAIMAN-WIKSMAN et al., 2007, NILSSON et al., 2008, LAN et al, 2013), da proliferação celular (SPRAVCHIKOV et al., 2001), elevação da taxa de apoptose (BAUMGARTNER-PARZER et al., 1995; DEVECI et al., 2005), além da diminuição da taxa de contração da ferida (BADILLO et al., 2007). Há também um desequilíbrio na renovação (síntese e degradação) de componentes extracelulares (NEELY et al., 2000, BRAIMAN-WIKSMAN et al., 2007, LAN et al, 2013). A migração reduzida de fibroblastos em resposta à hipóxia e fatores de crescimento também foi relatada (LERMAN et al.,

2003). Mais recentemente, nosso grupo observou uma redução da velocidade de migração de fibroblastos derivados de animais diabéticos e células expostas *in vitro* à glicose elevada (25 mM) (ALMEIDA, 2011; LAMERS et al., 2011).

Apesar de inúmeros estudos buscarem a compreensão dos mecanismos moleculares que promovem a cicatrização deficiente no DM, poucos têm abordado os efeitos da hiperglicemia sobre o comportamento dos fibroblastos, especialmente sobre o processo migratório – evento biológico importante na cicatrização.

1.4 Migração celular e hiperglicemia

A migração celular é um processo fundamental em praticamente todos os organismos multicelulares, desde o desenvolvimento embrionário até a homeostasia de diversos tecidos adultos. De modo geral e sucinto, o processo de migração celular compreende um ciclo coordenado de quatro eventos: (1) protrusão da parte dianteira do corpo celular, (2) adesão à MEC, (3) deslocamento do corpo celular e (4) retração da parte traseira (RIDLEY et al., 2003). Este processo é direcionado por sinais extracelulares que podem ser recebidos de células vizinhas ou da MEC via receptores celulares, ativando complexas vias de sinalização reguladoras do citoesqueleto de actina e de microtúbulos. Este arranjo da rede de filamentos protéicos e o comportamento migratório, de forma geral, são dependentes de um grupo de proteínas sinalizadoras de baixo peso molecular (20-30 kDa) com atividade GTPásica pertencentes à família Rho (de Ras-Homology) (TAKAI et al., 2001). As GTPases Rho mais estudadas são RhoA, Rac1 e Cdc42.

A interação coordenada entre célula-MEC durante todo o processo migratório é muito importante, já que determina os pontos de ancoragem da

célula ao substrato, o desencadeamento da sinalização para a organização do citoesqueleto e progressão do movimento celular. Essa interação, denominada adesão celular, ocorre principalmente por meio de integrinas, que são receptores protéicos transmembrana, formados por duas subunidades - uma cadeia alfa (α) e uma cadeia beta (β), associadas não covalentemente (LAUFFENBURGER et al, 1996; PALECEK et al, 1996; PLOW et. al., 2000). Atualmente existem cerca de 24 tipos de integrinas, que resultam da combinação de 8 diferentes subunidades β e 18 subunidades α . A especificidade de ligação depende da combinação de subunidades. Interações bidirecionais entre o citoesqueleto de actina e integrinas coordenam a adesão, sinalização, tensão e organização do citoesqueleto, permitindo à célula um movimento direcional. Durante a migração celular, além de GTPases Rho, outras GTPases também são relevantes por regular o tráfego de vesículas; particularmente, a reciclagem de integrinas e outros receptores importantes neste processo.

Conforme citado anteriormente, poucos estudos têm avaliado o papel da hiperglicemia sobre o comportamento migratório dos fibroblastos. Lerman et. al. (2003) demonstraram que fibroblastos dérmicos obtidos de camundongos diabéticos migraram menos (~75%) em comparação aos fibroblastos normoglicêmicos e também eram menos responsivos à hipóxia, produziam menos fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e mais metaloproteinase-9 (MMP-9). Estudos de nosso laboratório mostraram que a condição hiperglicêmica levou ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e afetou negativamente a migração de fibroblastos sobre fibronectina, reduzindo sua velocidade e direcionalidade. Este efeito foi acompanhado de um aumento na atividade das GTPases Rac1 e RhoA, além de um aumento da frequência de protrusões não produtivas e de uma redução na estabilidade e persistência destas protrusões, assim como na maturação das adesões junto à fibronectina (LAMERS et al., 2011). Muitos dos efeitos foram revertidos com a utilização de antioxidantes, comprovando que o estresse oxidativo promovido pela hiperglicemia afeta negativamente a adesão e migração de fibroblastos (LAMERS, 2008, 2011).

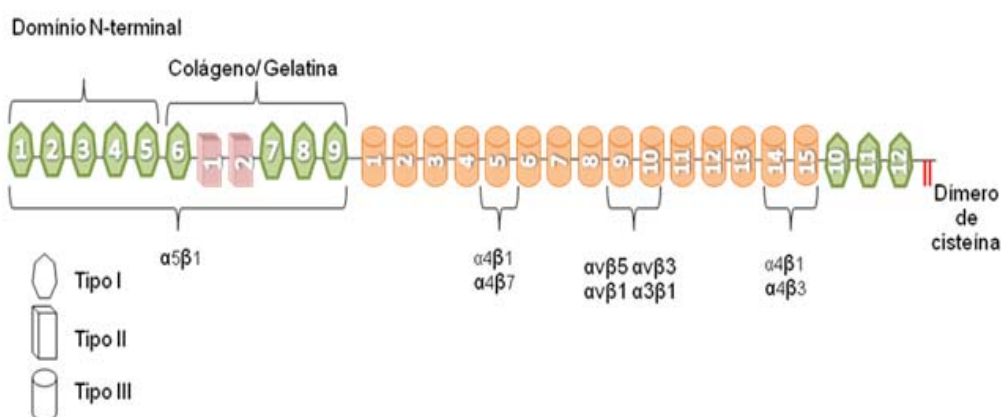
Nosso grupo também mostrou que os efeitos da hiperglicemia sobre a migração de fibroblastos foram prejudiciais em matriz bidimensional (2-D) de colágeno tipo I (embora em menor grau que sobre fibronectina) e em matriz tridimensional (3-D) contendo colágeno I e fibronectina, sugerindo que mecanismos básicos da interação célula-MEC podem estar afetados, além de função de diferentes integrinas ligantes de colágeno e fibronectina (LAMERS, 2011; ALMEIDA, 2011). Sabe-se que a interação entre fibroblastos e colágeno pode ser mediada pela integrina $\alpha 2\beta 1$, embora outros receptores, como $\alpha 1\beta 1$ por exemplo, desempenhem a mesma função. Já a ligação com a fibronectina ocorre principalmente através das integrinas $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$, dentre outras (WIESNER et al, 2005). Demonstramos que o espraiamento de fibroblastos derivados de animais diabéticos sobre estes dois substratos estava prejudicado (ALMEIDA, 2011) e que a distribuição das subunidades de integrinas $\alpha 5$ e αv estava reduzida na fração de membrana destas células, quando comparadas às células derivadas de animais normoglicêmicos (ALMEIDA, 2011; ALMEIDA et. al., em preparação).

Curiosamente, a fibronectina exógena acelerou os fibroblastos derivados de animais diabéticos, embora uma diferença muito significativa entre células de animais controle e diabéticos tenha ainda persistido. Dentre os efeitos promovidos pela fibronectina exógena observou-se um aparente aumento de expressão da subunidade αv de integrinas na superfície celular (ALMEIDA et al., em preparação).

Sabe-se que as células em cultura secretam fibronectina e constroem uma matriz pericelular com esta glicoproteína, utilizando para isso integrinas $\alpha 5\beta 1$ (SCHWARZBAUER, DESIMONE, 2011). Esta matriz é muito importante para a migração celular (PANKOV, YAMADA, 2002;). A fibronectina é uma glicoproteína de alto peso molecular que deriva de um único gene, mas pode apresentar muitas isoformas devido ao *splicing* alternativo (SCHWARZBAUER, DESIMONE, 2011). Dímeros de fibronectina ligam-se à superfície celular por meio de diferentes integrinas e apresentam domínios que se ligam a outras proteínas da MEC (PANKOV, YAMADA,

2002; ALBERTS et al., 2010). É possível que a fibronectina exógena não sirva apenas como substrato para adesão, mas que seja internalizada pelas células e que retorne à superfície celular por meio do tráfego intracelular de vesículas, conforme já demonstrado (SUNG et al., 2011).

Figura 1 - Diagrama ilustrando a molécula de fibronectina.



Cada molécula é formada por domínios repetidos tipo I, tipo II e tipo III, conforme indicado. As diferentes integrinas que podem se ligar aos domínios estão representadas (Modificado de PANKOV, YAMADA, 2002).

A fibronectina e outras moléculas da MEC secretadas pelos fibroblastos trafegam do retículo endoplasmático rugoso para o Complexo de Golgi, onde sofrerão modificações pós-traducionais, e dali para grânulos de secreção. Estudos realizados no laboratório utilizando microscopia eletrônica de transmissão mostraram um aumento no volume do retículo endoplasmático rugoso em fibroblastos derivados de animais diabéticos e em fibroblastos de linhagem (NIH3T3) expostos à glicose elevada, o que pode ser um indicativo de estresse do retículo e/ou uma intensa atividade proteica (ALMEIDA, 2011). É possível que células derivadas de animais hiperglicêmicos secretem menos fibronectina, mas este aspecto ainda não foi estudado.

1.5 Tráfego intracelular

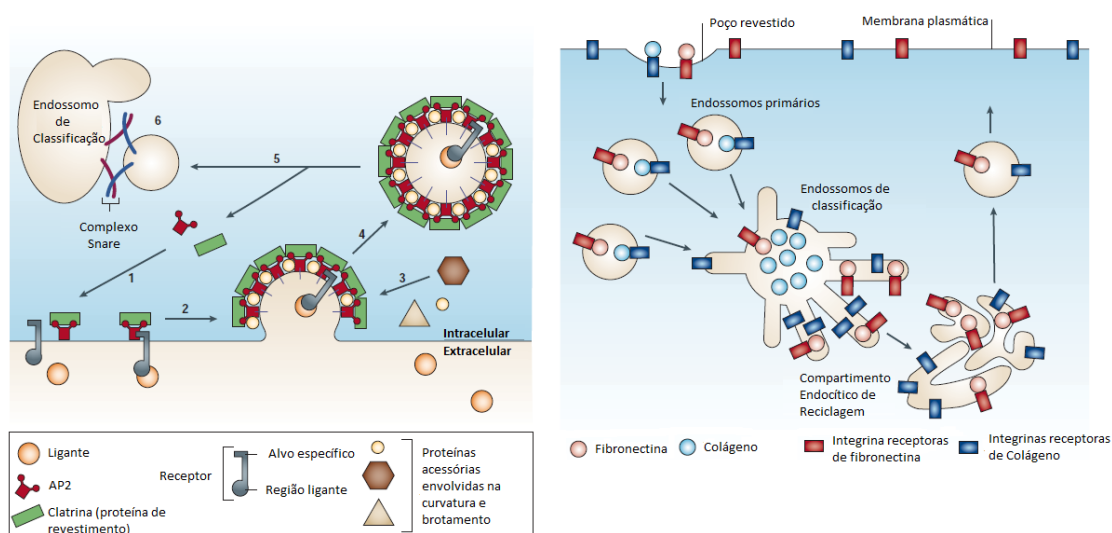
O tráfego intracelular exerce um papel fundamental no fluxo de diferentes moléculas endocitadas (componentes de membrana, ligantes associados a receptores, etc.) para vários compartimentos intracelulares (MAXFIELD; MCGRAW, 2004). A membrana plasmática internaliza cargas através de endossomos primários que, dependendo de moléculas sinalizadoras e da carga, são direcionados para a degradação (através de endossomos tardios e lisossomos), ou vão para endossomos de classificação, onde serão enviados para a via de reciclagem e voltam para a membrana plasmática, podendo ser reutilizadas centenas de vezes (HSU; PREKERIS, 2010).

O processo de reciclagem de integrinas e outros receptores é bastante utilizado pelas células durante a migração, ajudando a manter suas funções na superfície celular. Em células aderentes esta reciclagem ocorre na parte traseira da célula, em domínios que contém clatrina ou outras proteínas de revestimento, recrutadas para a membrana plasmática juntamente com proteínas adaptadoras (AP2, por exemplo); cargas específicas são direcionadas para este local de montagem do endossomo inicial (etapas 1 e 2 da figura 2).

O endossomo revestido com clatrina precisa ser fechado e fissionado, processo que ocorre através de ações coordenadas de proteínas acessórias como a epsina e a endofilina (que induzem o dobramento da membrana), da dinamina (responsável pela fissão da vesícula com a membrana) e da amfifisina (que se liga à endofilina, clatrina, proteínas adaptadoras e dinamina) (etapas 3 e 4 da figura 2). Muitas proteínas envolvidas ligam-se a fosfoinositóis, cinases lipídicas e fosfatases, que desempenham um importante papel na formação dessas vesículas.

Quando livres no citoplasma, o revestimento de clatrina dos endossomos é desfeito, permitindo a reutilização de seus componentes. Os novos endossomos fundem-se a endossomos pré-existentes e endossomos de classificação, que através do complexo SNARE e de moléculas de endereçamento são encaminhados para a parte frontal da célula para serem reinseridos na membrana e seus componentes, por fim, reutilizados (etapas 5 e 6 da figura 2) (MAXFIELD; MCGRAW, 2004).

Figura 2 - Formação de endossomo e a via de reciclagem.



O esquema da esquerda ilustra a formação de um endossomo, que pode ocorrer em diversas regiões celulares. Exemplifica-se a cobertura com clatrina, embora outras proteínas de revestimento (como a COP, por exemplo) pudessem ser utilizadas. Na figura da direita ilustra-se o caminho trilhado pelo endossomo contendo integrinas e seus ligantes até o destino final (Modificado de MAXFIELD; MCGRAW, 2004).

Os endossomos iniciais apresentam um pH baixo, que auxilia na separação das integrinas dos seus ligantes e assegura que estas serão reinseridas na membrana completamente capazes de se ligar novamente à MEC. Facilita também a detecção e remoção de integrinas danificadas ou

que sofreram *cross linking* enquanto estavam na membrana. Algumas proteínas estão muito presentes nestes endossomos, como por exemplo as chaperonas, que auxiliam na seleção das integrinas danificadas e no seu encaminhamento diretamente para lisossomos, para serem degradadas. Acredita-se que os mecanismos responsáveis pela reciclagem das integrinas da parte traseira para a parte dianteira da célula sejam cruciais para a velocidade e direcionalidade da migração celular (CASWELL; NORMAN, 2006).

Dentre as subunidades de integrinas muito importantes na migração celular encontra-se a beta (β)1, presente em 12 dos 24 heterodímeros formados pelas subunidades α e β . Esta subunidade possui um grande domínio extracelular, com capacidade para, juntamente com diferentes subunidades alfa (α), ligar-se a diversos componentes da MEC como colágenos, laminina e fibronectina. O domínio citoplasmático é curto e destituído de qualquer atividade enzimática intrínseca. Ao se ligar a proteínas da MEC, a integrina (dímero) muda sua conformação e afinidade, participando de adesões essenciais para a migração (BARKAN; CHAMBERS, 2011).

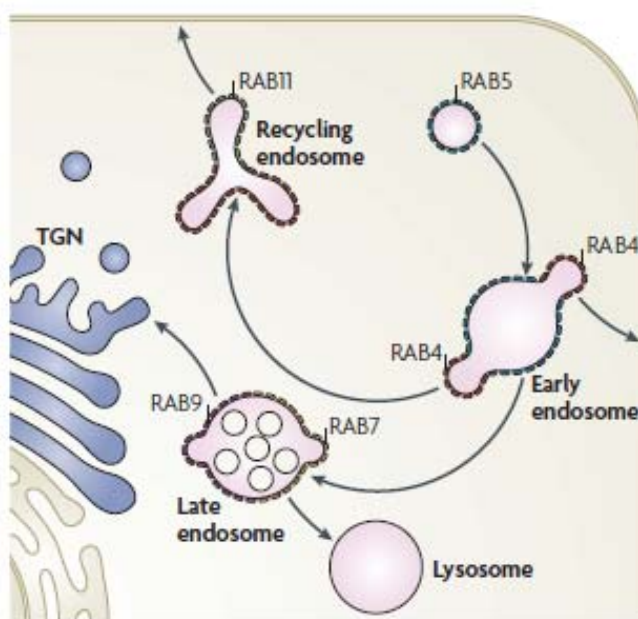
1.6 GTPases Rab

As vias de endocitose, reciclagem e exocitose precisam ser altamente reguladas para garantir o correto endereçamento das suas cargas. Esse mecanismo envolve diversas famílias de proteínas, recrutadas em diferentes etapas do tráfego intracelular. As proteínas de cobertura são requeridas durante o brotamento e seleção de cargas, as proteínas motoras impulsionam as vesículas ao longo dos microtúbulos e filamentos de actina, os fatores de ancoragem acoplam a vesícula aos seus receptores e as SNARES são importantes para que ocorra a fusão das membranas (HORGAN; MCCAFFREY, 2011). Todo este mecanismo é regulado

principalmente por proteínas da família Rab de GTPases (pertencentes à grande família Ras), com mais de 60 membros descritos. Cada GTPase está presente em diferentes membranas intracelulares, desempenhando um papel central na regulação do brotamento dos endossomos, seleção da carga, direcionamento, endereçamento e fusão (ALBERTS et al., 2010; HORGAN; MCCAFFREY, 2011; STENMARK, 2009).

Para conferir o direcionamento dos endossomos, diferentes Rabs são expressas durante os passos sequenciais do transporte, o que permite a diferenciação dos endossomos. Nos eventos iniciais da via endocítica estão presentes Rab5 e Rab15, atuando como antagonistas entre si. Enquanto a Rab5 facilita a separação da carga durante a formação dos endossomos cobertos com clatrina (juntamente com outras moléculas já descritas), promove a contração do citoesqueleto e a fissão do endossomo inicial, a Rab15 inibe o transporte de endossomos iniciais (STEIN; DONG; WANDINGER-NESS; 2003).

Figura 3 - Formação do endossomo primário e classificação das cargas.



O endossomo primário é formado e inicia-se a classificação das cargas de acordo com a sua viabilidade: cargas que sofreram danos serão encaminhadas para a degradação através de endossomos tardios que exibem Rab7 em sua membrana; cargas que podem ser reutilizadas serão encaminhadas novamente para a membrana celular através de endossomos de reciclagem responsáveis por ela. (STENMARK, H.; 2009).

Depois de formados, os endossomos iniciais são encaminhados para os endossomos de classificação, contendo *early endosome antigen 1* (EEA1), onde serão direcionados para vias correspondentes. Moléculas destinadas à reciclagem comumente são colocadas em endossomos contendo Rab4 e microdomínios dos endossomos iniciais, permitindo que sejam incorporadas na membrana mais rapidamente; alternativamente, podem ser colocadas em endossomos contendo Rab11 e são transportadas pela periferia celular de volta para a membrana (Figura 3). Moléculas que serão degradadas são encaminhadas diretamente dos endossomos primários para endossomos tardios dependentes de Rab7, que também pode funcionar como um regulador *downstream* desses endossomos, facilitando o transporte para os lisossomos (STEIN; DONG; WANDINGER-NESS; 2003).

Apesar de o tráfego vesicular exercer um papel crucial na manutenção da homeostasia e migração celular, muito pouco se sabe sobre os efeitos da glicose elevada sobre o transporte, reciclagem e degradação de moléculas, especialmente moléculas de adesão à MEC.

6 CONCLUSÕES

- A elevada concentração de glicose diminui a fibrilogênese da fibronectina e altera, portanto, sua organização na MEC. Reduz também a expressão da subunidade $\beta 1$ de integrinas e sua distribuição na superfície celular, o que pode estar relacionado à menor fibrilogênese de fibronectina. Estes dois resultados contribuem para uma melhor compreensão da deficiência de migração dos fibroblastos sobre diferentes matrizes, especialmente sobre fibronectina.
- A concentração elevada de glicose diminui a formação dos endossomos primários e, conseqüentemente, a quantidade de cargas internalizadas. A via de degradação envolvendo endossomos tardios contendo Rab7 não foi alterada, mas os resultados sugerem uma menor atividade na via de reciclagem mais lenta envolvendo Rab11 e um aumento de atividade na via de reciclagem rápida envolvendo Rab4. É possível que a carga reciclada nas diferentes vias seja diferenciada (por exemplo, integrinas diferentes).

REFERÊNCIAS ¹

AGOLA J. O.; JIM P. A.; WARD H. H.; BAUSRAY S.; WANDINGER-NESS A. Rab GTPases as regulators of endocytosis, targets of disease and therapeutic opportunities. **Clin. Genet.**, v. 80, p. 305-318, 2011.

AGUIAR G. K. L. D.; VILLELA N. R.; BOUSKELA E. A Micro circulação no Diabetes: Implicações nas Complicações Crônicas e Tratamento da Doença. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.51, n. 2, p. 204-211, Jan. 2007.

ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WALTER P. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1268 p.

ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WALTER P. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 841 p.

ALMEIDA M. E. S. **Hiperglicemia e interação fibroblasto-matriz extracelular- influencias na adesão e migração em substratos bidimensional e tridimensional**. 2011, 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

AMMER A. G.; WEED S. A. Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. **Cell Motil. Cytoskeleton.**, v. 65, n. 9, p. 687-707. 2008.

BARKAN D.; CHAMBERS A. F. β 1-Integrin: A Potential Therapeutic Target in the Battle against Cancer Recurrence. **Clin. Cancer Res.**, v.17, n.23, p. 7219–23. 2011.

¹ De acordo com:

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

BLYSTONE S. D., et al. A molecular mechanism of integrin crosstalk: α v β 3 suppression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates α 5 β 1 function. **J. Cell Biol.**, v. 145, p. 889–897. 1999.

BRYCE N. S., et.al. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. **Curr. Biol.**, v. 15, p. 1276-1285. 2005.

CASWELL P. T.; NORMAN J. Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion. **Cell press.**, v.18, n. 6, p. 257-63. 2008.

CASWELL P. T.; NORMAN J. C. Integrin Trafficking and the Control of Cell Migration. **Traffic**, v.7, p. 14–21. 2006.

COSEN-BINKER L. I.; KAPUS A. Cortactin: The Gray Eminence of the Cytoskeleton. **Physiology**, v.21, p. 352-361. 2006.

COSTA P. E. **Efeitos da jararagina, uma metaloprotease-desintegrina do veneno de *Bothrops jararaca*, sobre a migração de células epiteliais e neutrófilos de ratos.** 2005, 70 f. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HALLIWELL B. Antioxidants in human health and disease. **Ann. Rev. Nutr.**, v.16, p. 33-50. 1996.

HAMED S.; ULLMANN Y.; EGOZI D.; DAOD E.; HELLOU E.; ASHKAR M.; GILHAR A.; TEOT L. Fibronectin Potentiates Topical Erythropoietin-Induced Wound Repair in Diabetic Mice. **J. Invest. Dermatol.**, v.131, n. 6, p. 1365–1374. 2011.

HINZ B.; ALT W.; JOHNEN C.; HERZOG V.; HANS-WILHELM K. Quantifying Lamella Dynamics of Cultured Cells by SACED, a New Computer-Assisted Motion Analysis. **Exp. Cell Res.**, v. 25, n. 1, p. 234 – 251. 1999.

HORGAN C. P.; MCCAFFREY M. W. Rab GTPases and microtubule motors. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 39, n. 5, p. 1202-1206. 2011.

HSU V. W.; PREKERIS R. Transport at the recycling endosome. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 22, n. 4, p. 528-534. Jun. 2010.

HYNES R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell Press.**, v. 110, n. 6, p. 673–687. 2010.

JOHANSEN J. S.; HARRIS K. A.; RYCHLY J. D.; ERGUL A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovasc. Diabetol.**, v.20, p. 45. Abr. 2005.

LAMERS L. M.; ALMEIDA E. S. M.; VICENTE-MANZANARES; HORWITZ F. A.; SANTOS F. M. High glucose- mediated oxidative stress impairs cell migration. **Plos one**, v. 6, n. 8. Agosto. 2011.

LAMMERMANN T.; BADER L. B.; MONKLEY J. S.; WORBS T.; WEDLICH-SLODNER R.; HIRSCH K.; KELLER M.; FOSTER R.; CRITCHLEY R. D.; FASSLER R.; SIXT M. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. **Nature**. v.435, p. 51-55. Mai. 2008.

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

MAXFIELD R.; MCGRAW E. Endocytic recycling. **Nat. Ver. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 2 p.121-132. February. 2004.

Organização Mundial de Saúde. Dados estatísticos. Ficha 312. Janeiro de 2011. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>. Acesso em : 11 mai. 2011.

PANKOV R.; YAMADA K. M. Fibronectin at a glance. **J. Cell Sci.**, v.15, n.115, p. 3861-3863. 2002.

POWELKA A. M.; SUN J.; LI J.; GAO M.; SHAW L. M.; SONNENBERG A.; HSU V. W. Stimulation-dependent recycling of integrin $\beta 1$ regulated by ARF6 and Rab11. **Traffic**, v.5, p. 20–36. 2004.

RATH E.; HALLER D. Mitochondria at the interface between danger signaling and metabolism: Role of unfolded protein responses in chronic inflammation. **Inflamm. Bowel. Dis.**, v. 18, n. 7, p. 1364-1377. 2011.

RIDLEY A. J.; PATERSON H. F.; JOHNSTON C. L.; DIECKMANN D.; HALL A. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. **Cell**, v. 70, p. 389-99. 1992.

RON D.; WATER P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat. Rev.**, v. 8, p. 519-529. 2007.

SAMALI A.; FITZGERALD U.; DEEGAN S.; GUPTA S. Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. **Int. J. of Cell Biol.**, v.2010, p. 11. 2010.

STENMARK H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. **Nat. Rev.**, v.10, p. 512- 525. 2009.

STEIN M. P.; DONG J.; WANDINGER-NESS A. Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v.55, n.11, p. 1421-1437. 2003.

SUNG B. H.; ZHU X.; KAVERINA I.; WEAVER A. Cortactin controls cell motility and lamellipodial dynamics by regulation ECM secretion. **Curr. Biol.**, v. 21, n. 17, p. 1460-1469. 2011.

TAKAI Y.; SASAKI T.; MATOZAKI T. Small GTP-binding proteins. **Physiol. Ver.**, v. 81, p.153-208. Maio. 2001.

TEHRANI, S., et al. Cortactin has an essential and specific role in osteoclast actin assembly. **Mol. Biol. Cell.**, v. 17, p. 2882-2895. 2006.

VALKO M.; LEIBFRITZ D.; MONCOL J.; CRONIN M. T.; MAZUR M.; TELSNER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions

and human disease. **Int. J. Biochem. Cell.**, v.39, n. 1, p. 44-84. Agosto. 2007.

VOLTAN A. R.; SARDI J. C. O.; SOARES C. P.; MACHADO M. P.; ALMEIDA A. M. F., MENDES-GIANNINI M. J. S. Early Endosome Antigen 1 (EEA1) decreases in macrophages infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 51, n. 7, p. 759–764. 2013.

WANG T.; MING Z.; XIAOCHUN W.; HONG W. Rab7: Role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic. **Cel. Signal.**, v. 23, n. 3 , p. 516–521. 2011.

WEAVER A. Cortactin and tumor invasiveness. **Cancer Lett.**, v. 8,n. 2, p. 157-166. 2008

WHITE D. P. et al. Alpha v beta3 and alpha5beta1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. **J. Cell Biol.**, v.177, p. 515–525. 2007.

WOODS, A. J., et al. PKD1/PKCmu promotes alphavbeta3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions. **EMBO J.**, v. 23, p. 2531– 2543. 2004.

WORTH D. C.; PARSONS M. Adhesion dynamics: Mechanisms and measurements. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 40, n. 11, p. 2397-2409. 2008.

WU H.; REYNOLDS A. B.; KANNER S. B.; VINES R. R.; PARSONS J. T. Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate. **Mol. Cell Biol.**, v. 11, p. 5113-5124.1991.