MAÍRA ESTANISLAU SOARES DE ALMEIDA

Papel da glicação do colágeno I e da alta concentração de glicose sobre a migração de fibroblastos

Tese 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 Doutor em Ciências

São Paulo
2015

MAÍRA ESTANISLAU SOARES DE ALMEIDA

Papel da glicação do colágeno I e da alta concentração de glicose sobre a migração de fibroblastos

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Marinilce Fagundes dos Santos

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

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

Almeida, Maíra Estanislau Soares de.
Papel da glicação do colágeno I e da alta concentração de glicose sobre a migração de fibroblastos / Maíra Estanislau Soares de Almeida. – São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos.

Tese (Doutorado) – 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: Migração celular.

Versão do título para o inglês: Role of collagen I glycation and high glucose concentration on fibroblast migration.

1. Diabetes mellitus 2. Fibroblasto 3. Glicação do colágeno I 4. Migração 5. Miosina II 6. Cicatrização de feridas 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/SBIB0116/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maíra Estanislau Soares de Almeida.

Título da Tese: Papel da glicação do colágeno I e da alta concentração de glicose sobre a migração de fibroblastos.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

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

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

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

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/

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

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

Com os pais que tenho

Com as irmãs que tenho

Com o marido que tenho

Com os amigos que tenho

Com a família que tenho

Só posso dedicar essa tese à sorte

De tê-los na minha vida!

Agradecimentos

"Se pude ver mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes". E você foi esse gigante! Mari, Obrigada pelas oportunidades, pelos desafios, pela confiança, pela ética profissional e pela rigorosidade que nos ensina a ter com nosso trabalho, pelas retiradas da minha zona de conforto, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade e pelo carinho. Gratidão é a palavra para descrever esses 6 anos no laboratório de migração celular. Obrigada!

Ao querido Dr. Rick Horwitz, grande cientista e incrível pessoa, que me cativou com sua visão sempre encantada com a ciência e pela pesquisa. Obrigada por me proporcionar a incrível experiência de conviver com você e com os seus alunos no seu laboratório na Universidade da Virginia.

Ao Prof. Marcelo Lamers, que sempre, esteja onde eu estivesse me mostrou o que precisava saber, seja na USP ou UVA. Muito obrigada, por seus ensinamentos, sua paciência, sua colaboração e sua confiança.

À queridíssima Dra. Sandra Sampaio. Muito obrigada por todas as palavras de carinho e incentivo, por toda a confiança em mim e na minha carreira. Obrigada pela sua amizade. Obrigada pela chance de conhecer e co-orientar as meninas, Ellen Kato e Luciana Pimenta. Obrigada meninas pela confiança e carinho.

Aos professores Drs. do Departamento de Biologia Celular e Tecidual: Alison Colquhoun, Chao Yun Irene Yan, Marília Seelaender, Vanessa Freitas, Patrícia Gama, Estela Bevilaqua e Fábio Savieiro. Principalmente aos professores que pude acompanhar como monitora do PAE e com os quais aprendi bastante: Maria Inês Borella, Sérgio Oliveira e Dânia Hamassaki. Muito obrigada!

Ao Professor Dr. Ruy Jaeger pelas inúmeras vezes que precisei utilizar seu laboratório, seus equipamentos e seus reagentes. Muito obrigada aos seus alunos, principalmente à Dra. Adriane Siqueira.

À Professora Dra. Dânia Hamassaki, à Professora Dra. Carolina Del Debbio e à técnica Priscila Sayami, pelas inúmeras vezes que precisei utilizar equipamentos, reagentes e qualquer ajuda. Muito obrigada por sempre estar disponível.

Aos técnicos do Departamento Fernando, Brás, Cláudio, Marley e Cruz, que sempre que precisei de ajuda estavam disponíveis. E à secretária Regina Valbom, por sempre me auxiliar nas minhas dúvidas burocráticas.

À querida amiga Emília Ribeiro. Pessoa de coração imenso e que tive a incrível sorte de conviver e aprender com ela. Obrigada pela amizade e pela sorte de ter você como amiga.

À Professora Dra. Silvya Stuchi Engler e sua aluna Paula Pennacchi e ao professor Dr. Niels Câmara e seu Pós-Doc Tárcio Braga. Muito obrigada pela colaboração e amizade!

Ao Professor Adriano Alencar e a Pós-Doc Mariana Sacrini pelos ensinamentos e pela colaboração com os experimentos de propriedades físicas.

Ao Laboratório da Dor, no Instituto Butantã, pelas inúmeras vezes que precisei fazer experimento e utilizar equipamentos lá. Muito obrigada à pesquisadora Dra. Vanessa Zambelli.

Ao Técnico Henrique Roffatto, do Instituto Butantã pelas vezes que precisei utilizar o microscópio confocal. Obrigada pela ajuda e pelo trabalho.

Ao técnico Mario Cruz, do CEFAP-USP pela sua incansável ajuda com análises e capturas no microscópio confocal e no in cell. Obrigada!

À querida Layla Testa, obrigada por dividir comigo a incrível experiência do Doutorado sanduíche, de morar em Charlottesville e de estar no lab, do Rick. Foram meses de intenso aprendizado e de convivência incríveis! Obrigada pela colaboração e pela amizade!

À querida Má, que me acolheu assim que cheguei no lab, mesmo falando muito (rsrs), me fez sentir parte daquele universo. E à Ana, por me mostrar várias faces da vida, pelo exemplo de persistência e determinação. Meninas, obrigada pela amizade e pelo carinho. Obrigada pelos momentos de vida dentro e fora do laboratório! Obrigada por fazerem esses 6 anos de convivência mais leves e com muitos risos. Sem vocês ia ficar difícil. Obrigada!

Aos alunos no lab 443: Cibele Gomes, Cilene Rebouças, Carol Serna, Álvaro Mendivelso, Douglas Santos e Robson Pontes. Obrigada pelo aprendizado da convivência diária.

Ao sexteto: Kelly Monteiro, Michele Alves, Juliana Florim, Gabriela Soares, Mariana Marin e Ana Flávia! Vocês alegram e suavizam meus dias! Obrigada pelas risadas e pelas besteiras.

Obrigada muito especial à técnica Gabriella Moraes, sempre presente e disposta a ajudar, sempre com um sorriso no rosto.

Às queridas Paola Branco, Tati Kanno e Magá Melo pelas conversas, conselhos, pela amizade e carinho. Obrigada meninas!

Aos colegas de Departamento, muitos que entraram comigo no Mestrado e que serão meus futuros colegas Doutores: Felipe Costa, Renata Gomes e Lázaro Wendel.

Ao Apoio financeiro da Capes e FAPESP (2012/15963-6).

”Que no fundo é simples ser feliz.
Difícil é ser tão simples”

RESUMO

ALMEIDA, M. E. S. **Papel da glicação do colágeno I e da alta concentração de glicose sobre a migração de fibroblastos.** 2015. 138 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de desordens metabólicas caracterizado pela hiperglicemia crônica. A metabolização da glicose elevada gera o estresse oxidativo e a glicosilação não enzimática de proteínas (glicação), graças à formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Estes dois fatores são responsáveis pela maioria das complicações de longo prazo desta doença, dentre elas a cicatrização deficiente de feridas. Durante a cicatrização, fibroblastos proliferam, migram, secretam e degradam matriz extracelular (MEC), além de secretar fatores de crescimento e de se diferenciar em miofibroblastos. De maneira geral, os componentes da MEC do tecido conjuntivo, como o colágeno, possuem meia-vida longa e estão sujeitos ao acúmulo de AGEs. Estudos prévios demonstraram que a glicose elevada reduz a migração de células (inclusive fibroblastos) in vitro ou fibroblastos derivados de animais diabéticos. Este estudo teve como objetivos: 1) avaliar o papel da glicação do colágeno I sobre a migração de fibroblastos dérmicos derivados de animais controle e diabéticos e 2) avaliar o efeito da alta concentração de glicose sobre a contratilidade celular, utilizando fibroblastos NIH-3T3. Utilizou-se ácido glioxílico para glicação in vitro do colágeno I obtido de cauda de rato. A glicação foi eficiente, havendo aumento de AGES e redução de aminas livres. A glicação não inibiu a polimerização do colágeno, mas a matriz apresentou fibras mais espessas. Houve redução da elasticidade e da resistência à tração no colágeno glicado. Em comparação ao controle, células derivadas de diabéticos apresentaram migração reduzida e maior co-localização de α-actina de músculo liso com fibras de estresse. Em todas as células, o colágeno glicado atrasou o espraiamento inicial e reduziu a velocidade de migração. Em células derivadas de diabéticos a migração foi completamente inibida, houve redução de integrinas β1 nas adesões e a proliferação foi reduzida. Propriedades viscoelásticas do citoesqueleto também foram alteradas. Em células NIH-3T3, a glicose elevada (30 mM) reduziu fibras de estresse e houve dificuldade de retração da parte traseira das células. A adesão, espraiamento e polaridade não foram alterados, mas houve redução na velocidade de migração e aumento da direcionalidade celular. Inibidores das cinases ROCK e MLCK promoveram efeitos diferenciados em células controle e sob glicose elevada, alterando a morfologia e velocidade celulares. A expressão de miosinas IIA (MIIA) e IIB (MIIB) não foi alterada pela glicose, mas houve alteração da distribuição intracelular de MIIB e menor fosforilação da cadeia leve de miosina II, sugerindo menor contratilidade. Ensaios utilizando Traction Force Microscopy mostraram uma menor força sobre o substrato exercida por células expostas à glicose elevada. Informações sobre a regulação do citoesqueleto em fibroblastos expostos à glicose elevada, assim como sobre o comportamento destas células derivadas de animais controle e diabéticos frente à uma matriz modificada pela glicose elevada, mais próximo do que ocorre in vivo, contribuem significativamente para uma melhor compreensão da cicatrização deficiente na pele de indivíduos diabéticos.

Palavras-Chaves: Diabetes Mellitus. Fibroblasto. Glicação do colágeno I. Migração. Miosina II. Cicatrização de feridas.

ABSTRACT

ALMEIDA, M. E. S. **Roles of collagen I glycation and high glucose concentration on fibroblast migration.** 2015. 138 p. Ph D. Thesis (Cell Biology and Tissue). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Diabetes Mellitus (DM) is a group of metabolic disorders characterized by chronic hyperglycemia. Glucose metabolism generates oxidative stress and non-enzymatic protein glycosylation (glycation), due to the formation of advanced glycation end products (AGEs). These two factors are responsible for the majority of long-term complications of the disease, including impaired wound healing. During the healing process, fibroblasts proliferate, migrate, secrete and degrade extracellular matrix (ECM), and secrete growth factors that regulate other cell types. They also differentiate into myofibroblasts. The components of connective tissue ECM, such as collagen, have long half-lives and are subject to the accumulation of AGEs under hyperglycemic conditions. Previous studies have shown that high glucose in vitro reduces cell migration (including fibroblasts), as well as the migration of fibroblasts derived from diabetic animals. This study aimed to: 1) evaluate the role of type I collagen glycation on migration of dermal fibroblasts derived from control and diabetic rats and 2) evaluate the effects of a high glucose concentration on cell contractility, important to cell migration, using NIH 3T3 fibroblasts. Glyoxylic acid was used for in vitro glycation of collagen I obtained from rat tails. Glycation was efficient, with increase of advanced glycation end products and a reduction of free amines. Glycation did not inhibit collagen polymerization, but the matrix fibers were apparently thicker, suggestive of increased intermolecular crosslinking. There was a reduction of elasticity and tensile strength in glycated collagen. Compared to the control, cells derived from diabetics showed reduced migration and increased co-localization of smooth muscle α-actin with stress fibers (intracellular bundles of actin and myosin II). In all cells, glycated collagen delayed the initial spreading and reduced migration velocity. In cells derived from diabetic rats migration was completely inhibited, there was great reduction of integrins containing the β1 subunit in adhesions and the proliferation was reduced. Viscoelastic properties of the cytoskeleton were also altered under these conditions. In NIH-3T3 cells, high glucose (30 mM) decreased the amount of stress fibers and there was difficulty in the retraction of the cell rear. Adhesion, spreading and polarity did not change, but there was a reduction in migration speed and increased cell directionality. Inhibition of ROCK and MLCK kinases differentially affected migration of cell cultured under low and high glucose, altering cell morphology and speed. The expression of myosin IIA (MIIA) and IIB (MIIB) was not affected by glucose, but there was a change in the intracellular distribution of MIIB and lower phosphorylation of the myosin II light chain, suggesting less contractility. Assays using Traction Force Microscopy showed a smaller force exerted on the substrate by cells exposed to high glucose. Information on the regulation of the cytoskeleton in fibroblasts exposed to high glucose, as well as on the behavior of these cells derived from control and diabetic animals on a matrix modified by high glucose, more similar to what occurs in vivo, significantly contribute to a better understanding of impaired wound healing on the skin of diabetic individuals.

Keywords: Diabetes Mellitus. Fibroblast. Collagen I Glycation. Migration. Myosin II. Wound healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Vias metabólicas intracelulares ativadas pelo metabolismo aumentado da glicose.. 26
Figura 2 - Morfologia de fibroblastos e miofibroblastos. 29
Figura 3 - Representação esquemática do procolágeno tipo I.. 32
Figura 4 - Reação de glicação.. 34
Figura 5 - Fibrila de colágeno e glucosepana. 36
Figura 6 - Etapas da migração do fibroblasto..... 39
Figura 7 - Representação da família das integrinas. 41
Figura 8 - GTPases Rho regulam o citoesqueleto durante a migração celular Rho, Rac1 e Cdc42 atuam em diferentes regiões da célula. 43
Figura 9 - Esquema representativo da miosina II nas suas conformações inativa e ativa... 45
Figura 10 - Representação da ativação de miosina pela MLCP..... 46
Figura 11 - Representação esquemática da fibra de estresse.. 47
Figura 12 - Medida da fluorescência emitida por AGES totais presentes nas amostras sob comprimento de onda de excitação de 370 nm e emissão de 440 nm..... 58
Figura 13 - Medida de aminas livres presentes nas amostras sob comprimento de onda de absorção de 345 nm.. 59
Figura 14 - Imagem obtida por microscopia multifotônica - SHG..... 60
Figura 15 - Imagem dos corpos de prova para o ensaio de tração. s. 62
Figura 16 - Ensaio de resistência à tração. Colágeno normal e glicado foram submetidos à mesma velocidade de deslocamento da garra móvel (5mm/min).. 62
Figura 17 - Ensaio de curva de crescimento sobre colágeno normal (não glicado) e sobre colágeno glicado.. 64
Figura 18 - Espraiamento celular após 1 hora..... 65
Figura 19 - Área do espraiamento celular após 1 hora. 66
Figura 20 - Análise da dinâmica de formação de protrusão ao longo de 30 minutos.. 67
Figura 21 - Análise do citoesqueleto de actina após 24 horas de plaqueamento 69

Figura 22 - Área do espraiamento celular após 24 horas de plaqueamento. 70
Figura 23 - Imunofluorescência para α-SMA em colágeno normal. 71
Figura 24 - Imunofluorescência para α-SMA em colágeno glicado.. 72
Figura 25 - Ensaio de migração em time-lapse. 73
Figura 26 - Trajetória da célula em ensaio de migração em time-lapse.. 74
Figura 27 - Análises da migração de fibroblastos derivados de ratos controle (C) e diabéticos (D). 75
Figura 28 - Imunofluorescência para integrina β1.. 76
Figura 29 - Imagem de cultura de fibroblastos dérmicos com microesferas eletromagnéticas aderidas. 78
Figura 30 - Ensaio de OMTC.. 78
Figura 31 - Ensaio de adesão de células NIH-3T3 cultivadas por 1 hora. 80
Figura 32 - Citoesqueleto de actina corado com faloidina conjugada com Alexa-488. 81
Figura 33 - Quantificação da área de fibroblastos após 24 horas sobre fibronectina 82
Figura 34 - Figuras ilustrativas dos eixos maior (L) e menor (l) de células LOW e HIGH. 83
Figura 35 - Distribuição de células de acordo com seu índice de polaridade. 84
Figura 36 - Citoesqueleto de actina de fibroblastos NIH-3T3 cultivados em gel tridimensional (3D) de colágeno I (0,850 mg/ml) e fibronectina (10 µg/ml).. 85
Figura 37 - Imagens representativas da migração de fibroblastos NIH-3T3 cultivados em meio LOW (LG) e HIGH (HG).. 88
Figura 38 - Imagens representativas da migração de fibroblastos NIH-3T3 cultivados em meio LOW (LG) e HIGH (HG) com ou sem inibidor de ROCK (Y27632-30 µm).. 90
Figura 39 - Imagens representativas da migração de fibroblastos NIH-3T3 cultivados em meio LOW (LG) e HIGH (HG) com ou sem inibidor de MLCK (ML-7 20 µm). 92
Figura 40 - Imagens representativas da migração de fibroblastos NIH-3T3 cultivados em meio LOW (LG) e HIGH (HG) com ou sem inibidor de MLCK (ML-7 20 µm) e ROCK (Y27632 30 µm).. 93
Figura 41 - Imunofluorescência para miosina IIA. 95
Figura 42 - Western Blotting para miosina IIA.. 96

Figura 43 - Imunofluorescência para miosina IIB. 97
Figura 44 - Western Blotting para miosina IIB. 98
Figura 45 - Imunofluorescência para MRLC.. 99
Figura 46 - Western Blotting para MLC fosforilada (pMLC). 100
Figura 47 - Ensaio de detecção de força sobre o substrato por *Traction Force Microscopy* (TFM). 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Índice de polaridade dos fibroblastos em meio LOW e HIGH..... 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-DG= 3-Deoxiglucona

AGE = Produto final de glicação avançada

CGC = Colágeno glicado, células controle

CGD = Colágeno glicado, células derivadas de diabéticos

CHO-K1 =do inglês, *Chinese Hamster Ovary Cell Line*

CML = Carboximetilisina

CNC = Colágeno normal, células controle

CND = Colágeno normal, células derivadas de diabéticos

D.O = Densidade óptica

DMEM = Meio de Eagle modificado por Dulbecco

EPM = Erro padrão da média

ERK1/2 = Cinase regulatória extracelular

EROS = Espécies Reativas de Oxigênio

F-ACTINA = Actina filamentosa

g''= atrito

g'= rigidez

g= módulo elástico total

GAP = Proteína ativadora de atividade GTPásica

GAPDH = Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Gbsnl= módulo elástico total

GEF = Fator de troca de nucleotídeos de guanina

GLUT = Transportador de glicose

GOLD = Dímero glioxal-lisina

HEPES = (4-2-hidroxiethil)-1-ácido piperazineethanesulfônico

HG = glicose elevada (30 mM)

Hz= Hertz

LG = glicose em concentração fisiológica (5 mM)

MEC = Matriz extracelular

MGO = Metilglioxal

ML-7= Inibidor de MLCK

MLC = Cadeia leve de miosina

MLCK = Cinase de cadeia leve de miosina

MLCP = Fosfatase de cadeia leve de miosina

MMPs = Metaloproteinases de matriz

MOLD = dímero Metlilglioxinal-lisina

MRCL = Porção regulatória da cadeia leve de miosina

NAC = N-acetil-cisteína

NAD = β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NIH = National Institutes of Health

OMTC = do inglês, *Optical Magnetic Twisting Cytometry*

Pa/nm= Pascal/nanômetro

PHEM = Tampão Pipes-Hepes-EGTA-$MgCl_2$

PKC = Proteina cinase C

pMLC = Cadeia leve de miosina fosforilada

pN = PicoNewton

RAGE = Receptor de AGE

RB = Tampão de reconstituição

ROCK = cinase de Rho

SBF = Soro fetal bovino

SHG = Second harmonic generation

TBS = Tampão Tris-salina

TFM = Microscopia de força de tração

TGF-β= Fator de crescimento transformante β

α-SMA= Alfa actina de músculo liso

Y-27632= Inibidor de ROCK

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22

2 REVISÃO DE LITERATURA 25

2.1 Diabetes Mellitus- considerações gerais 25

2.2 Cicatrização de feridas - papel do fibroblasto e miofibroblasto 27

2.3 Matriz extracelular 29

2.3.1 Colágeno 30

2.3.1.1 Colágeno tipo I 30

2.4 Alterações de matriz extracelular em condições patológicas 32

2.4.1 Glicação 33

2.5 Propriedades físicas e mecânicas do microambiente da MEC e sua influência sobre o comportamento celular 36

2.6 Migração celular 37

2.6.1 Citoesqueleto de actina 39

2.6.2 Integrinas 40

2.6.3 GTPases Rho 41

2.7 Miosina II 44

2.7.1 Miosinas IIA, IIB e IIC 44

3 OBJETIVOS 48

4 MATERIAIS E MÉTODOS 49

5 RESULTADOS 57

5.1 Padronização da glicação in vitro do colágeno tipo I 57

5.1.1 Detecção de AGEs totais 57

5.1.2 Ensaio de detecção de Aminas livres 59

5.1.3 Organização das fibras de colágeno tipo I em gel tridimensional avaliada por Second Harmonic Generation (SHG) 60

5.1.4 Colágeno tipo I glicado in vitro apresenta resistência à tração (tensão máxima e módulo de elasticidade) menor do que o colágeno controle 61

5.2 Ensaios biológicos com colágeno tipo I normal e glicado em fibroblastos derivados de ratos controles (C) e diabéticos (D) 63

5.2.1 Crescimento celular sobre colágeno normal e glicado 63

5.2.2 Espraiamento celular e arranjo do citoesqueleto de actina sobre colágeno normal e glicado 64

5.2.3 A glicação do colágeno altera o perfil de formação de protrusões de fibroblastos derivados de ratos controle (C) e diabéticos (D) 66

5.2.4 A glicação não altera a morfologia de fibroblastos derivados de ratos controles (C) e diabéticos (D) 68

5.2.5 Efeitos da glicação sobre a distribuição e expressão de alfa actina de músculo liso (α-SMA). 70

5.2.6 Glicação do colágeno afeta o comportamento migratório de fibroblastos derivados de ratos controles e diabéticos 72

5.2.7 Glicação altera a distribuição da subunidade de integrina β1 75

5.2.8 A glicação altera a rigidez e viscosidade do citoesqueleto 76

5.3 Efeitos da elevada concentração de glicose sobre a contratilidade de fibroblastos NIH-3T3 79

5.3.1 Alta concentração de glicose não altera a área de espraiamento e o número de células aderidas ao substrato 79

5.3.2 Células cultivadas em concentração elevada de glicose apresentam menos fibras de estresse que células controle 80

5.3.3 Fibroblastos em meio HIGH não alteram a polaridade celular comparados com fibroblastos em meio LOW 82

5.3.4 A concentração elevada de glicose altera a morfologia de células NIH-3T3 cultivadas em gel tridimensional (3D) de colágeno e fibronectina 84

5.3.5 A concentração elevada de glicose altera diversos parâmetros da migração de fibroblastos NIH-3T3 sobre fibronectina 86

5.3.6 A utilização do inibidor de ROCK (Y27632) altera a morfologia em células LOW, mas não de células HIGH e não altera a velocidade de migração 88
5.3.7 A utilização do inibidor de MLCK (ML-7) não alterou a morfologia em células LOW, mas alterou em HIGH e aumentou a velocidade de migração, ... 90
5.3.8 A utilização dos inibidores de MLCK (ML-7) e ROCK (Y27632) juntos altera a morfologia de células LOW, mas não de células HIGH e diminui a velocidade de migração..... 92
5.3.9 A concentração elevada de glicose não altera a expressão e distribuição de miosina II A em fibroblastos NIH-3T3 94
5.3.10 A concentração elevada de glicose altera a distribuição, mas não a expressão de miosina II B em fibroblastos NIH-3T3 96
5.3.11 A concentração elevada de glicose não altera a distribuição da porção regulatória da cadeia leve de miosina II (MRLC) em fibroblastos NIH-3T3..... 98
5.3.12 Fibroblastos cultivados em meio HIGH possuem menos MLC fosforilada (menor atividade de miosina II) comparados com fibroblastos cultivados em meio LOW..... 99
5.3.13 Fibroblastos cultivados em meio HIGH exercem menor força de tração sobre o substrato, detectada pela técnica de Traction force Microscopy (TFM), quando comparados a fibroblastos cultivados em meio LOW 100
6 DISCUSSÃO 103
7 CONCLUSÕES 115
REFERÊNCIAS* 116
ANEXOS. 133

1 INTRODUÇÃO

Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de desordens metabólicas que acomete mais de 360 milhões de pessoas no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013) e, independentemente da sua etiologia, caracteriza-se pela hiperglicemia crônica. Na hiperglicemia ocorre um aumento da captação de glicose pelas células, que ocasiona um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas mitocôndrias. EROs são altamente reativas, sendo capazes de interagir com proteínas e alterar sua função. Além do estresse oxidativo, que deriva de um desequilíbrio entre a geração de EROs e a defesa antioxidante celular, um evento frequente no DM é a glicação de moléculas, processo aleatório e espontâneo que ocorre entre carbonilas de açúcares e porção amina de proteínas, formando produtos irreversíveis de glicação avançada (AGEs), que são insolúveis (DEGENHARDT; THORPE; BAYNES, 1998). Proteínas com meia vida longa como o colágeno são mais sujeitos à glicação ao longo dos anos. Além disso, o colágeno possui os aminoácidos mais reativos à glicação, como a lisina e arginina. Estudos investigam os efeitos da glicação sobre propriedades físicas da matriz extracelular (MEC) e o que poderia afetar sua interação com as células (CHEN et al., 2002; FRANCIS-SEDLAK et al., 2009; HARTOG et al., 2005). Para isso, utiliza-se com frequência a glicação in vitro do colágeno por variados agentes glicantes, como o ácido glioxílico e glioxalato de sódio.

Dentre as complicações clínicas mais frequentes do paciente com DM encontram-se a retinopatia, nefropatia, cardiopatia, microangiopatia, neuropatia e cicatrização deficiente que, juntamente com outros fatores, contribui para as feridas crônicas, principalmente em membros inferiores. Estas feridas crônicas possuem elevada incidência, comprometem a qualidade de vida dos pacientes e acarretam custos elevados para o sistema público de saúde.

No DM o processo de cicatrização cutânea encontra-se alterado em diferentes aspectos, incluindo células inflamatórias, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos/miofibroblastos; estes últimos produzem diversos fatores de crescimento, proteínas da MEC e metaloproteinases de matriz (MMPs). Pelo fato de fibroblastos

desempenharem função central na cicatrização e reparação de tecidos lesados e de serem os principais constituintes celulares do tecido conjuntivo, responsáveis por sintetizar e degradar os componentes da MEC, sua alteração funcional pode afetar significativamente a cicatrização. Apesar de sua importância, poucos estudos avaliaram detalhadamente o papel da hiperglicemia sobre fibroblastos. Loots et al. (1999, 2002) demonstraram que fibroblastos derivados de úlceras crônicas de pacientes hiperglicêmicos proliferam menos que aqueles derivados de pacientes normoglicêmicos e respondem diferentemente a fatores de crescimento mitogênicos. Ainda, Lerman et al. (2003) mostraram que a migração de fibroblastos provenientes de camundongos diabéticos foi diminuída em torno de 75%; estes fibroblastos também eram menos responsivos à hipóxia, produziam menos fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e mais metaloproteinase-9 (MMP-9). Mais recentemente, foi observado que a glicose elevada afeta negativamente a migração de fibroblastos, reduzindo a sua velocidade e direcionalidade (LAMERS et al., 2011). Este efeito foi acompanhado de um aumento da freqüência de formação de protrusões de membrana instáveis e pouco persistentes. A menor persistência destas protrusões, por sua vez, foi acompanhada de uma diminuição da maturação das adesões junto à MEC, um processo que depende da atividade de miosina II. Naquele estudo observou-se também que muitos dos efeitos da glicose excessiva foram parcialmente ou totalmente revertidos pelo tratamento com um agente antioxidante (N-acetilcisteína - NAC), demonstrando que estavam associados ao estresse oxidativo (LAMERS et al., 2011).

A migração celular é um processo cíclico que envolve a protrusão de um processo celular na direção do movimento denominado lamelipódio, rico em filamentos de actina, com a formação de adesões ao substrato de MEC. Posteriormente algumas adesões amadurecem e servem como pontos de inserção de feixes contráteis de actina e miosina II (fibras de estresse), que fazem a contração do corpo celular e impulsionam a célula para a frente. Fibroblastos derivados de ratos diabéticos apresentam menor expressão de receptores de fibronectina (integrinas contendo subunidades αv e α5) na superfície celular

e uma reduzida fibrilogênese de fibronectina pericelular (em fase de elaboração)[1]. Além disso, apresentam uma cauda alongada, morfologia típica de células com deficiência de contratilidade, e diminuição da velocidade migração também sobre colágeno I, em matriz bidimensional ou tridimensional (ALMEIDA, 2011).

Considerando que *in vivo* os fibroblastos dérmicos em condições de hiperglicemia migram deficientemente em um microambiente contendo componentes da MEC afetados pela glicação, este estudo abordou aspectos relacionados à deficiência de migração promovida pela glicose em fibroblastos frente à MEC (colágeno I) normal e MEC glicada.

[1] Almeida MES, Monteiro KS, Kato EE, Sampaio SC, Braga TT, Camara NOS, Lamers ML, Santos MF. Diabetes Mellitus Reduces the Cell Surface Expression of Fibronectin Receptors in Rat Dermal Fibroblasts and Impairs Cell Adhesion and Migration. 2015.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes Mellitus- considerações gerais

Todos os tipos de DM são caracterizados pela hiperglicemia e pela perda relativa ou absoluta da ação de insulina, levando aos quadros clássicos das complicações de longo prazo desta doença (GIACCO; BROWNLEE, 2010).

A elevada concentração de glicose extracelular aumenta o fluxo na via glicolítica, dependendo da quantidade de glicose captada pelas células. A glicose é uma molécula hidrofílica, necessitando de transportadores específicos para ser transportada para o meio intracelular. Intracelularmente, com as sucessivas etapas da glicólise, a glicose gera piruvato, que pode ser convertido em lactato no citosol ou ser levado até a mitocôndria onde é convertido a Acetil CoA e, por meio do ciclo de Krebs e da cadeia transportadora de elétrons, contribui para a síntese de ATP. No DM, em alguns tipos celulares, há aumento da captação de glicose pelas células frente à hiperglicemia, ocasionando um aumento do metabolismo da glicose e consequente aumento de atividade da cadeia transportadora de elétrons, ocasionando um aumento na geração de EROs pela mitocôndria. EROs são altamente reativas, sendo capazes de interagir com proteínas e alterar sua função. Na via glicolítica, o aumento de EROs leva a uma diminuição da atividade da enzima gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), enzima chave da via, responsável pela conversão de gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato, com a liberação de H^+. A atividade reduzida desta enzima leva ao acúmulo de metabólitos de etapas anteriores desta via, como frutose-6-fosfato e glicose-6-fosfato, que são substratos para a via do poliol, via das hexosaminas, ativação de diferentes isoformas da proteína cinase C (PKC) e formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Figura 1). De maneira geral, a ativação destas vias bioquímicas contribui para a ocorrência de complicações devido ao aumento de geração de EROs e depleção de defesas antioxidantes (BROWNLEE, 2001).

As alterações e complicações causadas pelo DM variam de acordo com o tecido e com o tipo celular. Células que expressam altos níveis do transportador de glicose 1

(GLUT1), como células endoteliais e fibroblastos, são incapazes de regular a concentração de glicose intracelularmente, sendo mais susceptíveis aos danos da hiperglicemia (SINGH et al., 2014).

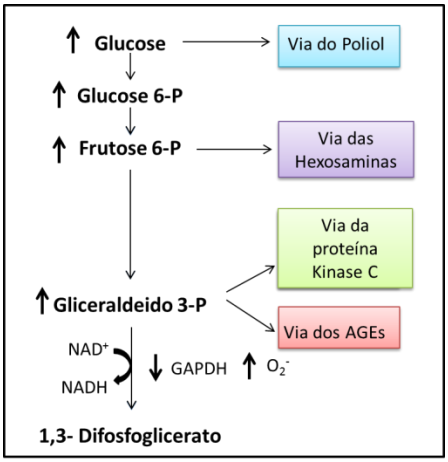


Figura 1- Vias metabólicas intracelulares ativadas pelo metabolismo aumentado da glicose. A superprodução mitocondrial de espécies de oxigênio ($O_2^{\cdot-}$), induzida pela hiperglicemia, inibe parcialmente a enzima GAPDH, favorecendo a ativação das quatro vias que potencializam o dano celular: (1) via do poliol, (2) via das hexosaminas, (3) via da PKC e (4) formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs).

Além de EROs, evidências mostram que AGEs aumentados aceleram a severidade das complicações do DM. Uma vez formados, AGEs, levam ao dano celular por três mecanismos: 1) as proteínas intracelulares modificadas pelo AGE possuem sua função alterada; 2) as proteínas da MEC alteradas interagem de maneira incorreta com integrinas (receptores de MEC), alterando as respostas de sinalização intracelulares e 3) a ativação do receptor de AGEs (RAGE) gera diversas mudanças na expressão gênica e proteica (GOLDIN et al., 2006).

Dentre as principais complicações clínicas do DM encontram-se: retinopatia, nefropatia, cardiopatia, microangiopatia, neuropatia e a cicatrização deficiente que, juntamente com outros fatores, contribui para as feridas crônicas, principalmente em membros inferiores. Estas feridas crônicas possuem elevada incidência, comprometem a qualidade de vida dos pacientes e acarretam custos elevados para o sistema público de

saúde. Atualmente, no Brasil, dados da Sociedade Brasileira de Diabetes (2012) mostram 12 milhões de pessoas com Diabetes Mellitus. Caso medidas adicionais às que já existem não venham a ser implementadas, a tendência desse número é aumentar, assim como o gasto do sistema público de saúde. Já que diversas complicações do DM podem ser letais a longo prazo e os hábitos populacionais têm piorado, há também uma tendência de menor sobrevida desses pacientes.

2.2 Cicatrização de feridas - papel do fibroblasto e miofibroblasto

A cicatrização é um processo fisiológico que ocorre ao longo de várias fases, culminando na homeostase tecidual e, por fim, restauração da integridade funcional do tecido. Este processo envolve vários tipos celulares e pode ser divido em quatro fases: 1) hemostasia; 2) inflamação; 3) formação do tecido de granulação e 4) remodelação tecidual.

Logo após a injúria, as plaquetas se agregam e formam o tampão plaquetário, impedindo o extravasamento do sangue. Em seguida, ocorre a chegada de neutrófilos, iniciando a resposta inflamatória aguda (1-2 horas) e sinalizando para a chegada de macrófagos, que participam da resposta inflamatória crônica (24-48 horas).

Durante o processo de cicatrização de feridas ocorrem eventos como a angiogênese, proliferação celular, migração de células para o local da lesão, deposição e remodelação da MEC (principalmente de colágenos tipos I e III e fibronectina), contração e remodelação da ferida. Estes processos envolvem diferentes tipos celulares, principalmente fibroblastos/miofibroblastos e células epiteliais (queratinócitos e células endoteliais) (MARTIN, 1997).

O fibroblasto é a principal célula presente no tecido conjuntivo, exercendo papel central durante a cicatrização de feridas e o remodelamento tecidual. Esta célula é responsável pela produção de colágeno, fibronectina, elastina e outros componentes da MEC, além de produzir MMPs e serem importantes durante o remodelamento mecânico da MEC. Ao final da fase inflamatória os fibroblastos migram, proliferam e podem diferenciar-se em miofibroblastos para formação do tecido de granulação e para realizar o

remodelamento da ferida. Além disso, os fibroblastos secretam fatores de crescimento, como TGF-β e FGF, importantes para modular o comportamento de outros tipos celulares (p. ex. queratinócitos e células endoteliais) e também atuam autocrinamente. Ao final, dependendo do tipo e do local da lesão, a cicatrização culmina com o fechamento da lesão e reestabelecimento da integridade tecidual.

Diversos eventos importantes para a cicatrização estão alterados em diabéticos: há diminuição da angiogênese (FALANGA, 2005), aumento de apoptose de queratinócitos e células endoteliais (BAUMGARTNER-PARZER et al., 1995; DEVECI et al., 2005), desequilíbrio entre produção e degradação de MEC por MMPs (NEELY et al., 2000; PIRILÄ et al., 2007; VAALAMO et al., 1997), alteração na proliferação de queratinócitos (SPRAVCHIKOV et al., 2001) e na proliferação e migração de fibroblastos (LAMERS et al., 2011; LERMAN et al., 2003) e na expressão de integrinas e fibrilogênese de fibronectina (em fase de preparação).[2]

Durante o processo de reparação tecidual, o fibroblasto residente na derme sofre com a perda da integridade mecânica e rapidamente tenta recuperar o tecido lesado, migrando para o local da lesão, secretando principalmente colágeno e fibronectina, podendo adquirir o fenótipo de miofibroblasto. Morfologicamente, miofibroblastos são caracterizados pela presença de um aparato contrátil constituído principalmente por actina e miosina II, formando as fibras de estresse. Há também a expressão de alfa-actina de músculo liso (α-SMA), que é regulada pela atividade de TGF-β. Estas células apresentam um retículo endoplasmático rugoso ativo, devido à sua intensa função secretória (GABBIANI; RYAN; MAJNE, 1971). Os feixes de actina e miosina dos miofibroblastos inserem-se em complexos de adesão à MEC de fibronectina denominados fibronexos. Estes complexos fazem mecanotransdução, transmitindo a força gerada pela contração das fibras de estresse para as proteínas da MEC localizadas no microambiente (CHRZANOWSKA-WODNICKA, BURRIDGE, 1996; DUGINA et al., 2001) (Figura 2).

[2] Almeida MES, Monteiro KS, Kato EE, Sampaio SC, Braga TT, Camara NOS, Lamers ML, Santos MF. Diabetes Mellitus Reduces the Cell Surface Expression of Fibronectin Receptors in Rat Dermal Fibroblasts and Impairs Cell Adhesion and Migration. 2015.

Fibroblastos Miofibroblastos

Figura 2- Morfologia de fibroblastos e miofibroblastos. Fibroblastos possuem morfologia de célula mesenquimal, com actina na região cortical e poucas adesões. Durante o processo de reparação tecidual, os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, apresentando mais fibras de estresse, expressando alfa-actina de músculo liso (α-SMA) e maiores adesões ao substrato. A organização do citoesqueleto contribui para a organização da MEC.

2.3 Matriz extracelular

A MEC exerce um papel importante na regulação do desenvolvimento e manutenção da homeostase dos tecidos e de células eucarióticas (MECHAM, 2012). É formada por uma rede tridimensional de componentes não celulares que estão presentes em diferentes composições e organizações em todos os tecidos. Todos os órgãos possuem uma MEC de composição única, definida nos estágios embrionários. As funções da MEC vão além de providenciar suporte físico para a integridade e elasticidade dos tecidos; a MEC é uma estrutura dinâmica que está em constante remodelamento para controlar a homeostase tecidual (HYNES, 2009). Dentre outras funções, a MEC participa ativamente da regulação da disponibilidade de fatores de crescimento, receptores, dos níveis de hidratação tecidual e do pH local (LU et al., 2011; MECHAM, 2012; NABA et al., 2012; ROZARIO, DE SIMONE, 2010).

Em mamíferos, a MEC é composta por aproximadamente 300 proteínas (matrissoma), incluindo-se proteínas que contribuem para a formação de fibras como colágeno e glicoproteínas como fibronectina e lamininas (MECHAM, 2012; HYNES, NABA, 2012).

2.3.1 Colágeno

Os colágenos são as proteínas mais abundantes da MEC. Foram identificados até o momento 28 tipos de colágeno, numerados com algarismos romanos (RICARD-BLUM, 2011). A estrutura básica de todos os colágenos é a tripla hélice, constituída por 3 cadeias distintas potencialmente codificadas por genes diferentes. Existe uma diversidade de isoformas moleculares para alguns tipos de colágeno (ex. colágenos IV e VI) (RICARD-BLUM, 2011). Níveis adicionais de complexidade podem ser atribuídos aos colágenos devido à possibilidade de liberação de fragmentos bioativos após a clivagem proteolítica e à exposição de sítios crípticos associadas a mudanças conformacionais, devido principalmente a interações com glicosaminoglicanos, à desnaturação ou por forças mecânicas (RICARD-BLUM, 2011).

De maneira geral, o colágeno constitui um tipo de família de proteínas selecionadas durante a evolução para exercer diferentes funções. Durante o processo de evolução dos organismos, o colágeno tornou-se especializado para exercer funções de resistência à tração, tensão, rigidez e em alguns casos elasticidade, de acordo com o tipo e os locais que podem ser encontrados, como por exemplo, tendões, pele, osso, cartilagem, músculo liso e lâmina basal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Colágenos podem ser subdivididos em subfamílias, baseados em sua estrutura supramolecular e função: colágenos fibrilares, colágenos associados a fibrilas, colágenos de ancoragem, colágenos que formam redes e colágenos que formam longas fibrilas (RICARD-BLUM; BALLUT 2011).

2.3.1.1 Colágeno tipo I

O colágeno tipo I, fibrilar, constitui o tipo de colágeno mais abundante em tecidos conjuntivos como ossos, derme e tendão. No estado fresco, estas fibras têm cor branca, são birrefringentes, podendo ser encontradas em feixes densos ou frouxos. Por exemplo, na derme, são encontrados em feixes densos não modelados (em diferentes direções),

enquanto que no tendão encontram-se na forma de feixes densos modelados (orientados na direção da força exercida pelo músculo sobre o tecido).

Provavelmente porque as fibrilas de colágeno do tipo I são as mais abundantes e amplamente distribuídas no organismo, sua biossíntese é a mais estudada (Figura 3). Os principais aminoácidos que constituem o colágeno são a glicina (33,5%), prolina (12%) e hidroxiprolina (10%). A biossíntese de colágeno em fibroblastos ocorre com a síntese de cadeias polipeptídicas (pré-procolágeno) nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER). Logo após a quebra do peptídeo sinal é formado o procolágeno (cadeia α), ainda no interior do RER. No RER ocorre também a hidroxilação de lisinas e prolinas, assim como a glicosilação em resíduos específicos de hidroxilisinas. Cada cadeia alfa é sintetizada com dois peptídeos de registro em suas porções amino e carboxiterminal, que permitem o alinhamento das 3 cadeias α-hélice de maneira correta. O procolágeno é então transportado para o Complexo de Golgi e posteriormente secretado para o meio extracelular com o auxílio de microtúbulos. Na MEC, os peptídeos de registro são removidos por peptidases (também secretadas pelos fibroblastos) e a molécula passa a ser chamada de tropocolágeno, sendo agora capaz de se polimerizar formando fibrilas e dar origem às diferentes subfamílias conhecidas de colágeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). No tecido as fibrilas de colágenos formam fibras, e as fibras se unem para formar feixes.

A síntese de colágeno envolve uma cascata própria de modificações bioquímicas, possibilitando defeitos, sejam por falhas enzimáticas ou por processos patológicos. Segundo Myllyharju e Kivirikko (2004) podem ocorrer hidroxilação em resíduos de prolina e lisina, glicosilação em resíduos de lisina e hidroxilisina e sulfatação em resíduos de tirosina que levam a uma interrupção na formação da tripla hélice. A propriedade mecânica de colágenos fibrilares é conferida pela presença de ligações cruzadas do tipo covalente, podendo ser: pontes dissulfeto (ESPOSITO; CAPUTO, 2005) pela via de lisil oxidase e pela atuação de AGEs (AVERY; BAILEY, 2006).

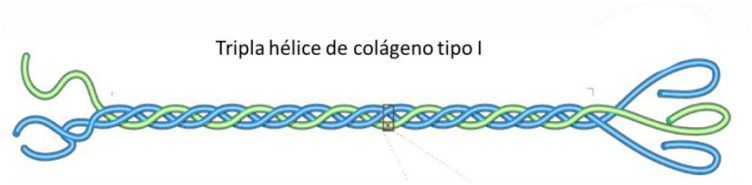


Figura 3- Representação esquemática do procolágeno tipo I. O colágeno tipo I é composto por 3 cadeias em α-hélice que se alinham nas suas extremidades. Adaptado de Brodsky e Baum, 2008.

De uma maneira geral, a renovação do colágeno é muito lenta e, para que ocorra, primeiramente ele precisa ser degradado por MMPs específicas, que são endopeptidades dependentes de zinco, pertencentes à superfamília das metzincinas. Estas enzimas participam tanto de processos fisiológicos (reparo tecidual, desenvolvimento) quanto em processos patológicos (DM, metástases, tumorigênese). Os colágenos dos tipos I, II e III são clivados principalmente pelas enzimas MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-14. O tipo I é clivado também pela MMP-2 (KLEIN; BISCHOFF, 2011). As MMPs também contribuem para a liberação de fragmentos bioativos (matrictriptinas), como p.ex. a endostatina e a tumstatina (RICARD-BLUM; BALLUT, 2011).

Segundo Hynes (2009), os colágenos fibrilares “não são apenas fibrilas bonitas”. As fibrilas e fibras estão imersas no ambiente extracelular, interagindo com vários receptores celulares, na sua maioria integrinas como p. ex. α1β1, α2β1, α10β1 e α11β1, todas interagindo com o domínio GFOGER (HYNES et al. 2007, 2009; HUMPHRIES; BYRON, 2006; LEITINGER; HOHENESTER, 2007). Vários fragmentos bioativos resultantes da clivagem do colágeno podem interagir com integrinas que classicamente não constituem receptores de colágeno, como p. ex. os receptores de fibronectina αvβ3, αvβ5, α3β1 e α5β1, que reconhecem o domínio RGD, dentre outros (RICARD-BLUM; BALLUT 2011).

2.4 Alterações de matriz extracelular em condições patológicas

Muitas patologias relacionadas com a MEC ocorrem por mutações que envolvem genes que codificam diferentes tipos de colágeno. Terapias celulares são promessas para distrofias como a *epidermolisis bulhosa* (KERN et al., 2009; CONGET et al., 2010) e *osteogenesis imperfecta* (NIYIBIZI; LI, 2009).

Adicionalmente, alterações nas moléculas de MEC podem ser observadas em doenças crônicas, como p. ex. no DM, câncer e artrite; processos fisiológicos como o envelhecimento também comportam alterações na MEC.

2.4.1 Glicação

A glicação é uma reação de glicosilação não enzimática e aleatória que ocorre em qualquer proteína, por envolver o grupo amina. Proteínas com meia-vida longa, como o colágeno, tendem a acumular mais AGEs. A formação de AGEs não está restrita ao DM; ocorre ao longo da vida e, portanto, aumenta com a idade. Vários AGEs promovem a ligação cruzada entre proteínas, contribuindo para uma insolubilização progressiva; no caso do colágeno, há um aumento gradual do seu grau de dureza em tecidos envelhecidos (RICARD-BLUM, 2012).

No DM, o alto índice de glicose no líquido intersticial e sangue pode induzir a glicação de várias proteínas estruturais, incluindo proteínas plasmáticas como a albumina e o fibrinogênio e proteínas da MEC como o colágeno (KHAN et al., 2009). A glicação avançada é a principal via envolvida no desenvolvimento e progressão das diferentes complicações que acometem os pacientes diabéticos, incluindo, neuropatia, retinopatia e nefropatia (SINGH et al., 2014).

A reação de glicação ocorre entre grupamentos de aminas livres de proteínas e grupamentos carbonilas de açúcares reduzidos e é conhecida também como reação de *Maillard* (HELOU et al., 2014). Essa reação é subdividida em três principais estágios: inicial, intermediário e final. No estágio inicial a glicose (ou outros açúcares como frutose, pentose e manose) reage com aminas livres para formar compostos instáveis, denominados bases de *Schiff,* que sofrem rearranjos para tornarem-se mais estáveis,

sendo conhecidos nessa fase por produtos de *Amadori* (MONNIER et al., 1996). Na fase intermediária, os produtos de *Amadori* degradam-se e transforma-se em dicarbonilas reativas como o glioxal, metilglioxial (MGO) e deoxulglucosonas através de reações de desidratação e oxidação. No estágio final da glicação são formados compostos estáveis e irreversíveis denominados produtos finais de glicação avançada (AGEs). Os AGEs são compostos fluorescentes, de cor amarelo-amarronzada e insolúveis que se acumulam em proteínas, interferindo com suas funções fisiológicas (LAPOLLA; BASSO; TRALDI, 2005). Exemplos de AGEs são carboximetilisina (CML), dímero glioxal-lisina (GOLD) e dímero metilglioxinal-lisina (MOLD), dentre outros (Figura 4).

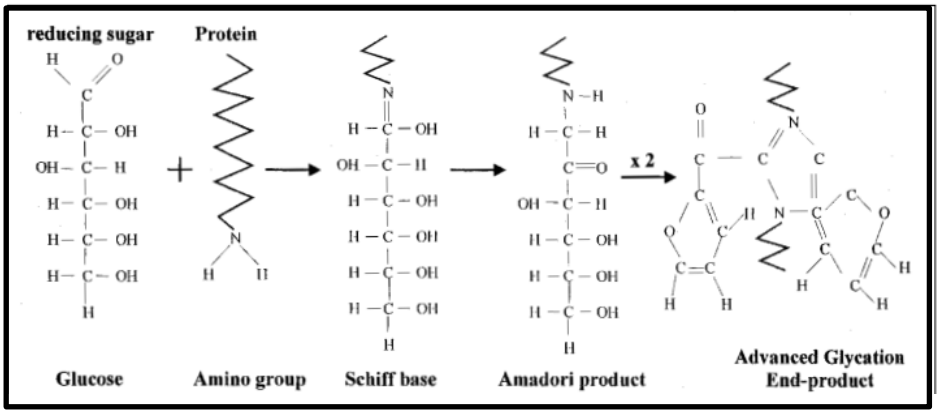


Figura 4- Reação de glicação. A reação inicia-se entre grupamentos carbonila de açúcares e grupamentos amina de proteínas, formando as bases de *Schiff*. Estas se rearranjam em produtos de *Amadori* que, com o tempo, formam os produtos finais de glicação avançada (AGEs) como a Carboximetilisina (CML). Adaptado de Knapowski; Wieczorowska-Tobis; Witowski, 2002.

O acúmulo de AGEs pode ocorrer em diversos tecidos do organismo como a cartilagem humana, colágeno da derme e fluido pericárdico (SIMM et al., 2007), vasos sanguíneos, ossos, dentes, córnea e humor vítreo (SINGH et al., 2014). Proteínas como o colágeno, que contém numerosos resíduos de lisina, arginina e hidroxilisina, são mais susceptíveis ao acúmulo de AGEs (BRONWLEE et al., 1988). AGEs detectados nos tecidos

podem ser classificados em três categorias: 1) ligações cruzadas fluorescentes (pentosidina), 2) ligações cruzadas não-fluorescentes (imidazolium dilysine) e 3) que não formam ligações cruzadas (carboximetilisina) (AHMED et al., 2005).

No organismo, o colágeno está constantemente exposto à glicose e seus derivados presentes em fluidos vasculares e extravasculares. As mudanças causadas pelos AGES envolvem perda da solubilidade da tripla hélice e também da sua flexibilidade, consequentemente aumentando a rigidez da molécula (AVERY; BAILEY, 2006). A glicação do colágeno pode aumentar a diferenciação e migração de miofibroblastos durante o desenvolvimento de fibrose no DM (YUEN et al., 2010). In vivo, a glicação diminui a migração e adesão de células tumorais, induz a perda e desorganização dos filamentos de F-actina e inibição de FAK (SAID et al., 2012) e pode ser fator importante para o aumento do desenvolvimento da placa de aterosclerose, alterando a função de células endoteliais (KEMENY et al., 2011). Pageon et al. (2014), mostraram que no modelo de glicação do colágeno em pele envelhecida reconstituída in vitro houve aumento da degradação por MMPs.

Com relação especificamente à glicação do colágeno, existem dois diferentes aspectos que devem ser considerados: 1) os efeitos biomecânicos do aumento de ligações cruzadas intermoleculares, resultando na modificação de propriedades físicas do colágeno, como p. ex. a elasticidade e 2) as interações do colágeno com domínios específicos presentes em proteoglicanos, MMPs e integrinas. Reigle et al., 2008, descreveram que o colágeno glicado apresenta afinidade de ligação reduzida com heparina e keratan sufato, dificultando a migração de células endoteliais. Outro estudo mostrou que sítios de ligação das integrinas α1β1 e α2β1 e de MMP-1 estão modificados no colágeno glicado (GAUTIERI et al., 2013).

É importante ressaltar que, embora alguns aminoácidos do colágeno favoreçam a glicação, não se conhecem quais aminoácidos são principalmente afetados pelos AGEs (GAUTIERI et al., 2014). Atribui-se, no entanto, grande parte da glicação do colágeno à glucosepana, que é um produto da reação de glicação entre lisina-arginina e glicose

descoberto por Lederer e Buhler (1999). A glucosepana é o AGE mais presente em pele humana senescente e em colágeno de indivíduos diabéticos (SELL et al., 2005) (Figura 5).

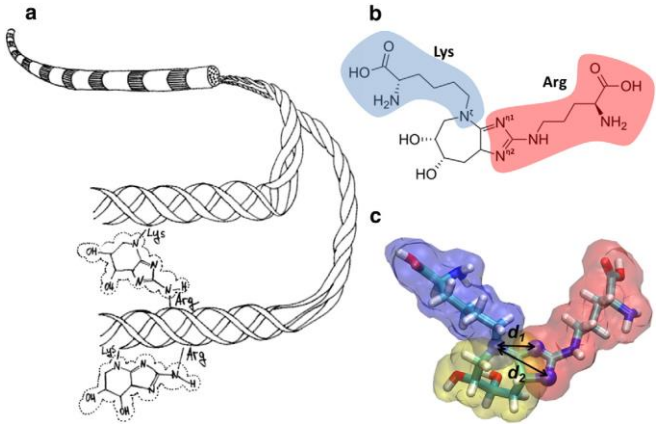


Figura 5- Fibrila de colágeno e glucosepana. a) representação esquemática da fibrila de colágeno e a formação de glucosepana, com a ligação covalente entre cadeias laterais de lisina e arginina. b) estrutura química da molécula de glucosepana, mostrando em azul lisina e em vermelho arginina e em c) modelo molecular de glucosepana, mostrando a distância entre os átomos terminais nos dois resíduos. Adaptado de Gautieri et al. (2014).

2.5 Propriedades físicas e mecânicas do microambiente da MEC e sua influência sobre o comportamento celular

As propriedades físicas e mecânicas da MEC são importantes reguladores do comportamento celular, em vários processos como espraiamento, migração, proliferação e diferenciação de células-tronco (DISCHER; JANMEY; WANG, 2005), durante o processo de desenvolvimento embrionário, homeostase de tecidos em adultos e em condições patológicas como no câncer e fibrose (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; LIAO; ZAKHALEVA; CHEN, 2009; PASZEK; WEAVER, 2004; PASZEK et al., 2005).

As forças percebidas pelas células podem ter origem exógena (provenientes do microambiente) ou endógena (geradas por elas mesmas). Forças exógenas incluem a tensão de cisalhamento, deformação e dilatação, p. ex., enquanto que as endógenas são geradas pelo rearranjo de proteínas do citoesqueleto (DEMALI; SUN; BUI, 2014; GASIOROWSKI; MURPHY; NEALEY, 2013). Diversas técnicas podem ser usadas para medir estas forças, como OMTC (*Optical Magnetic Twisting Cytometry)* e TFM (*Traction Force*

Microscopy). Na técnica de OMTC são utilizadas microesferas ferromagnéticas cobertas com um peptídeo sintético contendo uma sequência de aminoácidos presente em diferentes glicoproteínas adesivas da MEC, a sequência RGD, que acopla fortemente as esferas às integrinas ligantes de fibronectina e proteínas similares nas células (MORIYA et al., 2008). As esferas são magnetizadas horizontalmente e então é aplicado verticalmente um campo magnético externo homogêneo, que varia senoidalmente no tempo, gerando um torque. Com esses valores, podem ser obtidos dados de viscosidade, rigidez e elasticidade do citoesqueleto, importantes para o entendimento das propriedades físicas das células em diferentes condições.

Outra técnica bastante utilizada para o estudo das propriedades físicas do citoesqueleto e da matriz é a microscopia de força de tração (TFM). Esta técnica permite quantificar a tensão que a célula exerce no substrato através do uso de microesferas fluorescentes que são imersas em gel de poliacrilamida. As células são semeadas sobre o gel recoberto com MEC e, à medida que a célula se desloca, as microesferas sofrem também um deslocamento, gerando assim um campo de deslocamento, derivado da força exercida no substrato. Sabe-se que para a célula exercer tração sobre o substrato, complexas interações entre citoesqueleto, moléculas motoras (miosina), moléculas de adesão (integrinas) e associação com moléculas de MEC são essenciais e devem ocorrer corretamente.

O avanço da interdisciplinaridade das ciências biológicas, químicas e físicas corrobora para o desenvolvimento de novas tecnologias que melhoram a compreensão de processos de fabricação de substratos biomiméticos e a eficácia de biomateriais para auxiliar a comunidade científica a entender diversos processos fisiológicos e patológicos como a regeneração tecidual e cicatrização de feridas.

2.6 Migração celular

A migração celular é um processo fundamental para o desenvolvimento embrionário, para a homeostase dos tecidos e também para o estabelecimento de condições patológicas como doenças autoimunes, inflamação crônica, DM e metástases tumorais. Na cicatrização tecidual, a migração de fibroblastos e células epiteliais colabora para o fechamento de feridas e regeneração, sendo a migração de células endoteliais fundamental para o processo de angiogênese. No caso de doenças, a migração celular desregulada pode levar a doenças autoimunes e exercer papel central no processo tumoral e disseminação da metástase.

A migração desses diferentes tipos celulares ocorre em contextos definidos de substrato. Os fibroblastos migram preferencialmente imersos na MEC, num ambiente tridimensional. Embora todos os tipos celulares executem o mesmo processo básico de translocação sobre ou por dentro dos tecidos, cada tipo celular realiza a migração utilizando repertórios moleculares e guias extracelulares distintos.

Durante a migração, o movimento celular deve manter uma direção e velocidade definidas em resposta aos estímulos do microambiente. A migração pode ser estimulada, p. ex., por substâncias dissolvidas no meio ou associadas às superfícies, por estímulos de intensidade de luz (fototaxia) (SARANAK; FOSTER, 1997), por potencial eletrostático (galvanotaxia) (ERICKSON; NUCCITELLI, 1984), (BROWN; LOEW, 1994), ou também por potencial gravitacional (geotaxia) (LOWE, 1997). Propriedades mecânicas da MEC também influenciam na fibrilogênese de fibronectina, afetando indiretamente a migração (HALLIDAY; TOMASEK, 1995; SCHWARZBAUER; SECHLER, 1999), na rigidez do citoesqueleto (WANG; BUTLER; INGBER, 1993) e na força de ligação entre integrina e citoesqueleto (CHOQUET; FELSENFELD; SHEETZ, 1997); estes últimos eventos também influenciam a locomoção celular.

As variáveis-chave das propriedades mecânicas da MEC que regulam a migração celular são: confinamento celular no microambiente, rigidez da MEC, topologia da MEC e forças geradas pelo citoesqueleto e aplicadas às células e à MEC (CHARRAS; SAHAI, 2014).

O processo inicial, comum para todos os tipos de migração de células aderentes, é a polarização celular guiada pela actina e miosina, resultando na mudança do formato do

corpo celular (LAUFFENBURGER; HORWITZ, 1996, KEREN et al., 2008; RIENTO; RIDLEY, 2003). Didaticamente, divide-se a migração de uma célula mesenquimal, como o fibroblasto, em etapas distintas e sequenciais. Inicialmente ocorre a protrusão do lamelipódio em direção ao movimento, seguida da formação de adesões nascentes e posterior amadurecimento das adesões. Por fim, ocorre a contração do corpo celular, com a atividade de actina e miosina, e concomitantemente, as adesões antigas que foram formadas são desfeitas, deslocando a célula para frente. Como a migração é um processo cíclico, estas etapas se repetem (Figura 6).

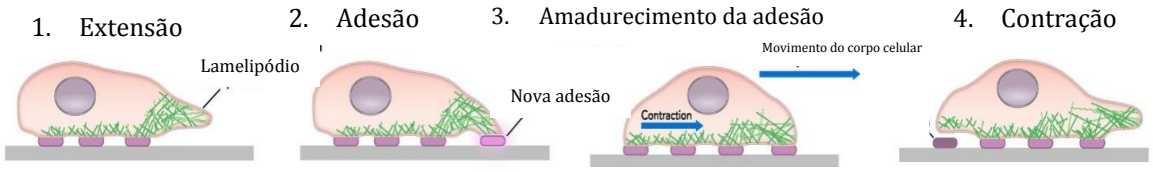


Figura 6- Etapas da migração do fibroblasto. A migração dos fibroblastos em substrato bidimensional é cíclica e composta por passos distintos e sequenciais: 1) extensão do lamelipódio; 2) estabelecimento de adesões nascentes; 3) amadurecimento das adesões e contração do corpo celular e 4) adesões são desfeitas e é iniciado um novo ciclo. Adaptado de Tschumperlin (2013).

2.6.1 Citoesqueleto de actina

Os filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários são os constituintes do citoesqueleto, sendo responsáveis pelas suas propriedades mecânicas e pelo formato celular, aspectos críticos para a migração celular. Além disso a actina é essencial para a sobrevivência da maioria das células, sendo importante na detecção de forcas mecânicas do microambiente, internalização de vesículas e divisão celular.

Os filamentos de actina são formados por subunidades de actina globular (G-actina) que se polimerizam para formar filamentos em forma de uma hélice. Na forma filamentosa (F-actina) a actina pode associar-se lateralmente a outros filamentos de actina por intermédio de diferentes proteínas como p. ex. a miosina, α-actinina e filaminas. A

depender do número e disposição dos filamentos e do tipo de proteínas ligantes, os filamentos de actina podem formar diferentes estruturas celulares como: 1) filopódios, 2) lamelipódios, 3) fibras de estresse e 4) arcos dorsais e ventrais (POLLAD et al., 2009).

Filopódios são protrusões longas e finas que emergem da superfície celular, formados por filamentos de actina arranjados em feixes paralelos, geralmente associados à tropomiosina e fascina (BLOCK et al., 2008). Eles possuem função de explorar o microambiente para onde a célula está se deslocando (MATTILA; LAPPALAINEN, 2008; MEJILLANO et al., 2004). Lamelipódios são estruturas formadas por filamentos ramificados, constituindo uma rede dendrítica. A lamela é uma região de transição entre o lamelipódio e o corpo celular. Em células móveis o lamelipódio possui aproximadamente 1 µm de distância desde a borda da membrana, enquanto que a lamela está 5–10 µm perto do núcleo (DANUSER, 2009; KOESTLER et al., 2008; PONTI et al., 2004; VALLOTTON; SMALL, 2009). As fibras de estresse são feixes contráteis formados por F-actina arranjada de forma antiparalela, intercalada com miosina II. São normalmente encontradas na região basal da célula, terminando em adesões focais. Os arcos (dorsal/ventral) são largos feixes de filamentos de actina que formam estruturas transversais (ligados às porções dorsais e laterais da célula), oferecendo suporte à célula. Algumas vezes terminam em adesões focais (HOTULAINEN; LAPPALAINEN, 2006).

2.6.2 Integrinas

Integrinas constituem os principais receptores celulares para componentes da MEC. São altamente expressas em todas as células nucleadas. São formadas por heterodímeros constituídos por uma subunidade α e uma subunidade β; a especificidade de ligação deve-se à combinação destas moléculas (BACZYK; CARRACEDO; GULLBERG, 2010). Até hoje foram identificadas 18 subunidades α e 8 subunidades β, mas apenas 24 integrinas foram descritas (LOU et al., 2007). Algumas subunidades de integrinas são expressas de forma ubíqua, enquanto outras são específicas. As integrinas podem ser

agrupadas em subgrupos de acordo com suas propriedades ou sua composição de subunidade (BACZYK; CARRACEDO; GULLBERG, 2010) (Figura 7).

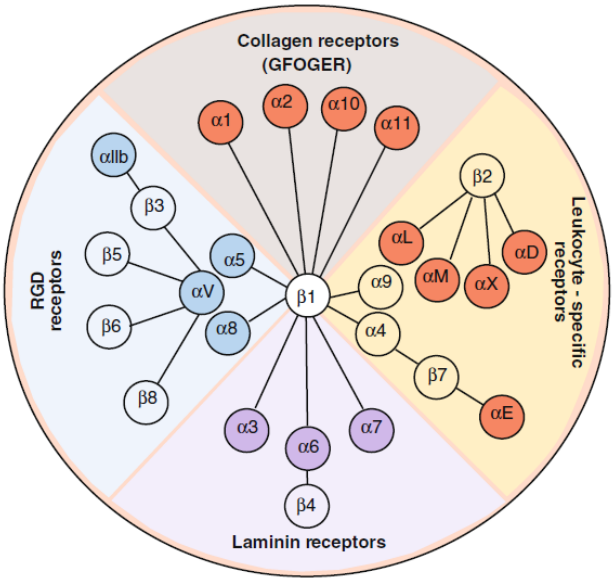


Figura 7- Representação da família das integrinas. Em vertebrados, a família das integrinas possui 24 heterodímeros. GFOGER = sequência mínima aminoácidos do colágeno para reconhecimento das subunidades de integrina. RGD= sequencia mínima de aminoácidos de fibronectina para reconhecimento de subunidades de integrinas. Adaptado de Baczyk; Carracedo e Gullberg, 2010.

A primeira função estabelecida para as integrinas foi de fazer a ligação entre o citoesqueleto e a MEC, para em seguida realizar a sinalização bidirecional – da MEC para a célula e vice-versa, e desencadear efeitos variados como regulação da proliferação, diferenciação, migração e morte celular, por exemplo. A regulação de integrinas é rápida e dinâmica em resposta a alterações no microambiente celular.

2.6.3 GTPases Rho

GTPases Rho constituem uma das cinco famílias de proteínas Ras: Ras, Rho, Arf/Sar, Ran e Rab (ROJAS et al., 2012). Os membros da família Ras são proteínas de baixo

peso molecular ligantes de GTP, com função central na sinalização por diversos estímulos extracelulares e regulando a transcrição de genes que influenciam o crescimento e diferenciação celulares (ROJAS et al., 2012). A família Rho está envolvida na sinalização que regula a organização do citoesqueleto, progressão do ciclo celular, polaridade, migração e adesão celular.

A proteína Rho foi descoberta acidentalmente em 1985 como uma proteína relacionada à Ras (Ras-homology) em *Aplysia,* e subsequentemente 18 genes foram codificados como *Rho-like proteins*, identificados no genoma humano, sendo Rho, Rac e Cdc42 aqueles melhor caracterizados (MADAULE; AXEL, 1985; HALL, 1998). Proteínas Rho são muito conservadas em eucarióticos e, classicamente, ciclam entre os estados conformacionais inativo (ligadas ao GDP) e ativo (ligadas ao GTP) (HALL, 2012). Na forma ativa interagem com diferentes proteínas alvo para produzir a resposta celular. Sua ativação é regulada por GEFs *(guanine-nucleotide-exchange factors*), que efetuam a troca de nucleotídeos, e sua inativação é catalisada por GAPs (GTPase-activating proteins), que aceleram a hidrólise do GTP. Adicionalmente, proteínas Rho inativas ligam-se a GDIs (guanine-nucleotide-dissociation inhibitors), que impedem a interação da GTPase com a membrana plasmática, mantendo-a inativa no citoplasma (CARPENTER et al., 1999; (HANSEN; NELSON, 2001).

Durante a migração celular, sabe-se que a localização e ativação das principais Rho GTPases são classicamente bem definidas e orientadas, como esquematizado na figura 8.

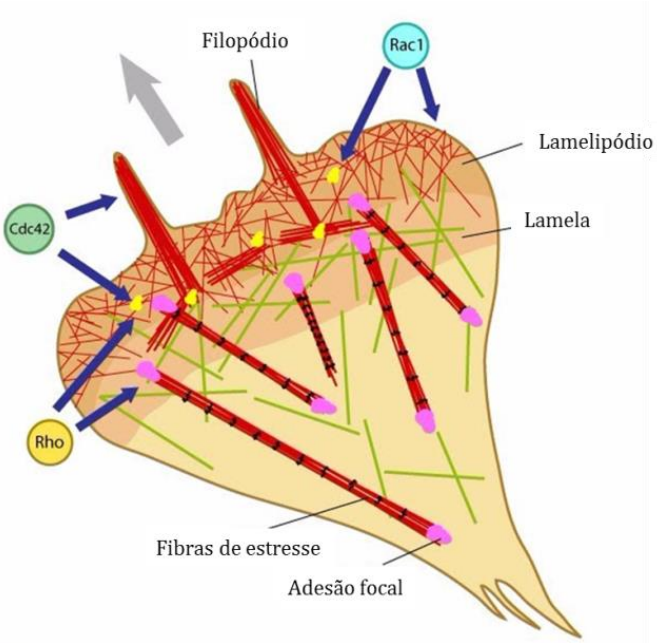


Figura 8- GTPases Rho regulam o citoesqueleto durante a migração celular. Rho, Rac1 e Cdc42 atuam em diferentes regiões da célula (indicadas pelas setas) para orientar a migração celular. Cdc42 controla a polaridade celular e a formação do filopódios e adesões nascentes. Rac1 orquestra a polimerização de actina para a formação do lamelipódio e atua na montagem e desmontagem de adesões nascentes e Rho atua na maturação das adesões, controla a formação de fibras de estresse e a atividade contrátil da parte traseira da célula. Adaptado de www.mechanobio.info.

Rac e Cdc42 são ativadas na frente da célula migratória, mas com diferenças e características espaciais e temporais. RhoA é predominantemente ativada no corpo celular e na parte de trás da célula, mas alguns estudos mostram sua ativação na parte da frente. Evidências sugerem que Rac e Cdc42 provavelmente possuem sobreposição na função em regular a formação de protrusões ricas em actina na região do lamelipódio. Sabe-se que a expressão apenas de Cdc42 ativa produção de filopódios e a expressão de Rac estimula a formação de largo lamelipódio, sendo a formação da protrusão na frente do corpo celular papel de ambas as proteínas. A ativação de Rho na região traseira da célula regula o amadurecimento de adesões, a formação de fibras de estresse e a atividade contrátil de miosina II (RIENTO; RIDLEY, 2003).

2.7 Miosina II

Miosinas constituem uma superfamília de proteínas motoras que exercem papel importante em vários processos celulares que requerem força e translocação. As miosinas podem caminhar sobre filamentos de actina e proporcionar o seu deslizamento, para gerar força de tensão sobre os filamentos de actina. Esta função requer energia, que é proveniente da hidrólise de ATP e necessita da existência de sítios catalíticos com atividade ATPásica nas miosinas.

A maioria das miosinas pertence à classe II e, juntamente com a actina, compõem as proteínas contráteis de músculo estriado cardíaco, esquelético e músculo liso. É importante ressaltar que moléculas de miosina II que se assemelham a seu músculo homólogo, em relação à estrutura e função, também estão presentes em todas as células não musculares eucarióticas (VICENTE-MANZANARES et al., 2011).

2.7.1 Miosinas IIA, IIB e IIC

As miosinas do tipo II não musculares (NMII) são moléculas compostas por 3 pares de peptídeos: duas cadeias pesadas de 230 kDa (MHC), duas cadeias leves reguladoras de 20 kDa (RLC) e duas cadeias leves essenciais de 17 kDa (ELC). As duas cabeças globulares das cadeias pesadas contém os sítios de ligação para ATP e actina, seguidas da região do pescoço, onde se ligam duas diferentes cadeias leves (ELC e RLC). A região do pescoço funciona como uma alavanca para ampliar a rotação da cabeça da miosina, devido à transformação da energia química de ATP em energia mecânica para realizar o movimento de deslocamento. Após a região do pescoço, segue-se uma longa região composta por uma α-hélice em espiral, que forma o domínio da cadeia pesada, terminando em uma cauda não-helicoidal (VICENTE-MANZANARES et al., 2009).

Existem três genes diferentes para miosinas (MYH9, MYH10 e MYH14) em células de mamíferos, que codificam as proteínas de cadeia pesada de miosina II, dando origem

às isoformas de miosina IIA, IIB e IIC, respectivamente. A ativação de miosinas envolve a fosforilação reversível de aminoácidos específicos presentes no par da cadeia leve regulatória (RLC). Os filamentos de miosina II que se encontram na conformação compacta, não fosforilados, apresentam um bloqueio das regiões de interação com ATP que podem ser fosforilados nos sítios de RLC. A fosforilação desfaz este bloqueio e permite que a molécula atinja sua conformação ativada, formando filamentos bipolares que promovem a interação com os filamentos de actina (VICENTE-MANZANARES et al., 2009) (Figura 9).

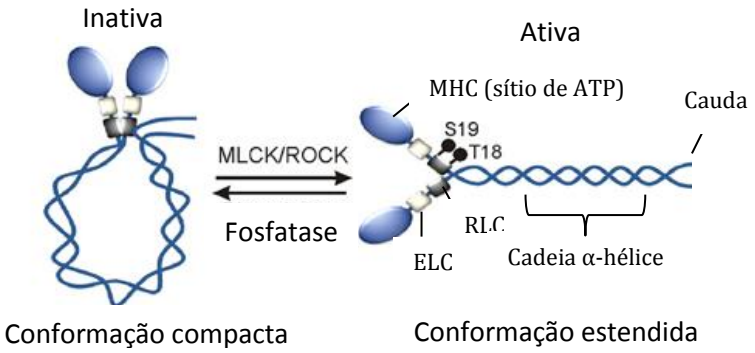


Figura 9- Esquema representativo da miosina II nas suas conformações inativa e ativa. A miosina II, quando se encontra no seu estado inativo, apresenta uma conformação compacta. Após fosforilação na região regulatória a molécula muda para o estado ativo e adquire uma conformação estendida. Modificado de BETAPUDI, 2014.

Uma vez ativada, a miosina II permite a sua fosforilação adicional, que depende do balanço de cinases e fosfatases, como p.ex. a cinase de cadeia leve de miosina (MLCK) e a fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP), respectivamente. A fosforilação da cadeia leve da miosina induz alteração de sua interação com a actina, promovendo a contração celular (RIENTO, RIDLEY, 2003). Para realizar este balanço, a MLCP defosforila a MLC, que é composta por três subunidades: a subunidade catalítica (PP1c), a subunidade alvo de migração de miosina (MYPT ou MBS) e uma pequena subunidade não catalítica, sem função definida. A fosforilação nos resíduos de MYPT inibe a atividade da MLCP e aumenta

a possibilidade de fosforilação MLC, consequentemente aumentando a contratilidade celular (RIENTO; RIDLEY, 2003) (Figura 10).

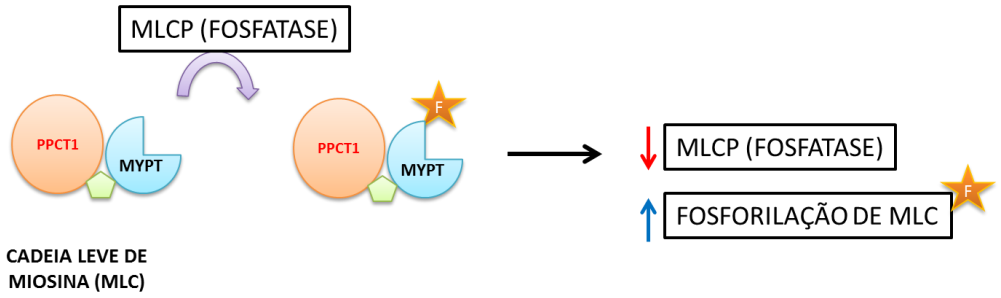


Figura 10- Representação da ativação de miosina pela MLCP. A fosforilação de miosina II depende do balanço entre a fosfatase MLCP e a fosforilação de MLC.

As cinases de MLC fosforilam a região regulatória da molécula nos sítios de serina (Ser19) ou treonina (Thr18), ou em ambos. Já foram relatadas várias outras cinases com este papel, incluindo a MLCK, ROCK (Rho–associated coiled coil-containing kinase), citron kinase e ZIPK ou DAPK3 (leucine zíper interacting kinase) (MATSUMURA, 2005; TAN et al., 2008; WENDT et al., 2001).

Sabe-se que a ativação dessas cinases ocorre sob estímulos diferentes: Ca^{+}-calmodulina ativa MLCK e a GTPase RhoA ativa ROCK e citron kinase, por exemplo. Segundo Totsukawa e col. 2000 e 2004, a MLCK, em alguns tipos celulares, localiza-se mais na periferia, enquanto ROCK estaria localizada mais na região central. Essa diferença na localização significa que as estruturas de actina e miosina na região central da célula, como fibras de estresse e adesões focais maduras, são mais estáveis do que as que se encontram na periferia. As mais perféricas seriam, portanto, mais responsivas aos diferentes estímulos, sinalizados por MLCK e dependentes de Ca^{+}-calmodulina.

Por fim, uma vez ativadas, as moléculas de miosina II formam os filamentos duplos, através da interação das suas α-hélices. São esses filamentos que se ligam à actina por meio do domínio da cabeça com atividade ATPásica, havendo uma mudança conformacional que promove o deslocamento antiparalelo dos filamentos de actina. Essa formação de feixes contráteis de actina e miosina forma a estrutura conhecida como fibra

de estresse, importante no processo de contração do corpo celular e da região traseira da célula durante a migração e, também, durante o amadurecimento de adesões (VICENTE-MANZANARES et al., 2009) (Figura 11).

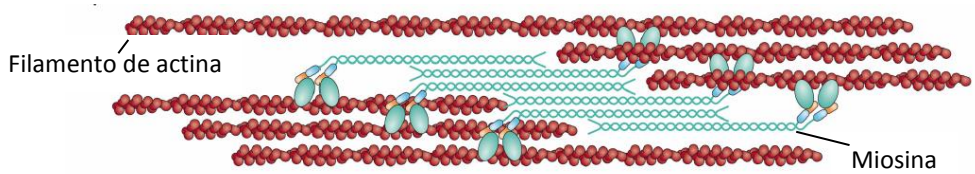


Figura 11- Representação esquemática da fibra de estresse. Os filamentos de actina estão representados em vermelho e os de miosina em azul. Durante a contração celular, a cabeça da miosina interage com a actina, realizando o encurtamento das fibras de estresse. Modificado de Vicente-Manzanares et al. (2009).

Em células migratórias, os filamentos de actina e miosina organizam e direcionam a formação da protrusão em direção ao movimento. Em fibroblastos, as isoformas de miosina II possuem diferentes papéis na polarização celular. A miosina IIA monta de forma dinâmica os cabos contráteis de actina e miosina (GIANNONE et al., 2004; VICENTE-MANZANARES et al., 2008). Em contrapartida, a miosina IIB incorpora-se aos filamentos contráteis de actina e miosina que ficam ali estacionários e definem o centro e a parte da cauda de células migratórias (VICENTE-MANZANARES et al., 2008). Desta maneira, as funções cooperativas entre miosina IIA e IIB induzem a formação de uma estrutura de actina e miosina na região não protrusiva da célula (região central e traseira), enquanto que a região de protrusão é formada apenas pela miosina IIA (VICENTE-MANZANARES et al., 2008).

3 OBJETIVOS

Esta tese teve como objetivo principal avaliar o papel da glicose elevada e da glicação do colágeno tipo I sobre a migração de fibroblastos. Mais especificamente, avaliar:

a) as consequências da glicação do colágeno tipo I sobre as interações célula-MEC e, consequentemente, sobre a migração celular. Utilizamos fibroblastos derivados de cultura primária de ratos controle e diabéticos;

b) os efeitos da glicose elevada sobre a contratilidade celular e expressão de diferentes isoformas de miosina II (A e B), utilizando fibroblastos da linhagem NIH-3T3 expostos à glicose em concentração fisiológica (5 mM) ou suprafisiológica (30mM).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e indução do Diabetes Mellitus: o protocolo de pesquisa utilizado está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira para Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) do ICB/USP, registrado sob número 35 na fls. 101 do livro 02. Foram utilizados ratos Wistar machos com 2 meses de idade provenientes do Biotério Central do ICB/USP. Após um jejum de 12 h, os animais foram sedados com isoflurano e os do grupo experimental foram injetados com estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal, intraperitoneal) diluída em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,5, enquanto os animais controle receberam apenas o veículo. A glicemia desses animais foi medida 48 h após a injeção e no momento do sacrifício. Apenas animais com glicemia superior a 300 mg/dL foram considerados diabéticos. Após 30 dias da injeção, os animais foram sacrificados por dose excessiva de ketamina (0,4 ml/100g) e xilazina (0,4 ml/100g) e foi removida a pele da região abdominal para a realização da cultura primária de fibroblastos.

Tipos e cultivos celulares: fibroblastos primários dérmicos foram obtidos a partir da pele de ratos dos diferentes grupos experimentais e utilizados por cerca de 5-6 passagens. Após a anestesia do animal realizou-se a tricotomia da região abdominal e remoção de um fragmento de pele de aproximadamente 4 cm^2. A derme foi retirada por raspagem com bisturi em ambiente asséptico e os fragmentos resultantes foram digeridos com colagenase 0,1% por 1 h a 37 ºC sob agitação constante, em banho-maria. Após a digestão enzimática, a colagenase foi inativada com meio DMEM contendo soro fetal bovino (SFB) 10%. Os fibroblastos foram cultivados em meio DMEM com 20% SBF, antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml) e Fungizona 1% em estufa umidificada contendo 8% de CO_2/92% ar. Posteriormente, a concentração de SFB foi reduzida para 10% e a Fungizona foi removida; as passagens foram realizadas semanalmente. As células de animais controle e diabéticos foram cultivadas em meio controle (glicose 5 mM) e meio com alta concentração de glicose (30 mM de glicose), respectivamente. Fibroblastos

murinos da linhagem NIH-3T3 obtidos da American Type Culture Collection (ATCC) foram doados pelo prof. Dr. Alan R. Horwits (University of Virginia) e cultivados em meio DMEM com 10% SBF e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 μg/ml) e mantidos em meio controle (glicose 5 mM) ou em meio com alta concentração de glicose (30 mM) por 15 dias.

Obtenção de colágeno tipo I a partir da cauda de rato: para obtenção do colágeno tipo I, as caudas foram coletadas imediatamente após a eutanásia, submetidas à assepsia em etanol 70% por 20 min e lavadas em água destilada estéril. Os tendões das caudas foram isolados e fragmentados com auxílio de pinça e tesoura. Os tendões foram colocados em frasco Erlenmeyer para a adição do ácido acético 0,5% (1,5g de tendão seco para 110 mL de ácido). O colágeno foi extraído após a incubação por 24-48 horas a 4 ^{O}C e agitação constante. O volume extraído foi transferido para um tubo estéril de 50 mL e centrifugado a 3.000 rpm por 2 horas a 4 ^{O}C, para a remoção de material insolúvel. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado e ao mesmo volume do colágeno obtido foi adicionado NaCl 20% (v:v) e uma nova centrifugação foi realizada a 3.000 rpm por 2 horas a 4 ^{O}C. No final, o volume de colágeno obtido foi novamente solubilizado em ácido acético 0,5 M (1:1). O colágeno foi obtido em forma de gel hidratado e estéril. Uma alíquota do colágeno foi separada para a determinação da proteína total e o restante foi liofilizado e armazenado a 4 ^{O}C. A proteína total do colágeno tipo I extraído da cauda de rato foi determinada utilizando o método do ácido bicinconínico (BCA).

Glicação do colágeno tipo I in vitro: para glicação do colágeno tipo I, 50 mg de colágeno liofilizado foram dissolvidos em 25 ml de HCl 1M. Posteriormente foram adicionados 25 ml de PBS estéril, pH 7.8, contendo 1,42 g de cianoborohidreto de sódio e 0,715 g de ácido glioxílico. Posteriormente, as soluções foram homogeneizadas por 24 horas à 37 °C, seguida de diálise em água destilada por 48 horas. As amostras foram armazenadas a -80 °C (ALIKHANI et al., 2007).

Avaliação da glicação: para medida da glicação utilizamos colágeno normal e glicado (1 mg/ml em 0,5 ml de ácido acético 0,5 M) para digestão em solução contendo 100 µg pepsina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) por 14 h a 37 ^{O}C, sob agitação. No final da incubação, o pH do material digerido foi ajustado para 7,0 com NaOH 0,5 N e centrifugado por 5 minutos a 10.000 g. O sobrenadante contendo o colágeno digerido foi usado para dosagem do material fluorescente. A avaliação de fluorescência em λ 370nm/440nm (excitação/emissão) para AGEs totais e em λ 328nm/378nm (excitação/emissão) para pentosidina foi feita em um espectrômetro de fluorimetria (PAGEON et al., 2007). Também medimos a fluorescência da albumina de pacientes diabéticos descompensados e pacientes normais. Essas amostras foram doadas pela professora Dra. Marisa Passarelli da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Análise do grau de glicação por consumo de aminas: a formação de ligações cruzadas foi medida através do consumo de aminas livres pela reação com o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), segundo (Francis-Sedlak *et al.*, 2009). 2 mg dos diferentes colágenos (não glicado e glicado) foram acondicionados em microtubos e liofilizados durante a noite. Os colágenos liofilizados foram incubados com 1 ml de $NaHCO_3$ 4% e 1 ml de TNBS 0,5% por 2 horas a 40 °C sob agitação em banho seco. Após 2 horas, foram adicionados à solução 3 ml de HCl 6 M e foi feita incubação adicional por 90 minutos a 60 °C. As amostras foram diluídas com 5 ml de água destilada e a absorbância foi medida a 345 nm.

Preparação do substrato com colágeno tipo I normal e colágeno glicado: para preparar a matriz de colágeno, 1 mg de colágeno liofilizado normal ou glicado foram pesados e diluídos em 1 ml de ácido acético 0,1 M gelado. As soluções foram dissolvidas no gelo com auxílio de vórtex e homogeneizadas com pipetas estéreis. Utilizou-se a concentração de 100 µg/ml, diluídos em PBS gelado. As placas de cultura foram recobertas com colágeno normal ou glicado e deixadas polimerizar em estufa à 37 ºC por 1 hora. Em seguida, foram realizadas três lavagens com PBS.

Avaliação do citoesqueleto de F-actina durante espraiamento celular: as células foram plaqueadas em placas recobertas com os diferentes substratos e posteriormente (1 hora ou 24 horas) foram fixadas e permeabilizadas com paraformaldeido 4% contendo 0,5% Triton X-100 e 5 % de sacarose em tampão PHEM (Pipes 60mM, Hepes 2mM, Egta 10m, $MgCl_2$ 2mM, pH 6.9) por 5 minutos e pós-fixadas com paraformaldeido 4% em PHEM por 15 minutos. Após sucessivas lavagens com PHEM + glicina 100 mM as células foram coradas com faloidina-Alexa 488 (Molecular Probes) na concentração 1:700 por 1 hora e o núcleo com DAPI (Vectashield).

Preparação da matriz tridimensional (3D) de colágeno tipo I/fibronectina: para preparar a matriz, foram misturados colágeno tipo I derivado de cauda de rato (concentração final 1.7 mg/ml), meio de cultura DMEM 10 x, tampão de reconstituição (0,2 M HEPES e 0,02M $NaHC0_3$ - RB 10 x), SFB (1% no volume final) e 10 µg/ml fibronectina derivada de plasma humano (GIBCO®). 5 x 10^3 células foram ressuspensas no gel não polimerizado, posicionado em placas de cultura contendo a lamínula de vidro de 12 mm de diâmetro. Os discos foram incubados a 37 ^{o}C por 2 horas, para a polimerização do colágeno. Após este período, foram adicionados 2 ml de meio DMEM 1 x com 10% de SFB e antibióticos.

Análise por Second Harmonic Generation (SHG): para a análise por SHG, os géis foram preparados como descrito no item acima, excluindo-se a adição de células. Os géis foram fixados com paraformaldeido 4% em PBS por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram levadas para o microscópio confocal multifotônico. A técnica de SHG utiliza a óptica não-linear, permitindo captar o contraste gerado pelas fibras de colágeno, naturalmente anisotrópicas, permitindo a observação da sua organização no gel polimerizado. A análise foi feita no Centro de facilidade de Apoio à Pesquisa da USP (CEFAP-USP).

Ensaio de migração em time-lapse em substratos 2D: 5 x 10^2 células foram semeadas em placas de 24 poços cobertas com fibronectina (1µg/ml) ou colágeno tipo I controle ou glicado (100 µg/ml) e após 24 horas foram realizados ensaios de time-lapse, nos quais as imagens foram obtidas em sistema InCell Analyzer 2200 (GE, Healthcare) em 5% CO_2 a 37 ^oC. Utilizamos objetiva de 10 x e as imagens foram obtidas a cada 20 minutos durante um período de 18 horas. As imagens foram agrupadas seqüencialmente e analisadas utilizando o programa de domínio público Image J (NIH). A trajetória de células individuais foi monitorada e obteve-se a velocidade e distância percorrida. Para os ensaios com inibidores em NIH 3T3, após 4 horas do início do filme foram adicionados aos poços da placa os inibidores: 1) Y27632 (30 µm); 2) ML-7 (20 µm); 3) Y27632 (30 µm) + ML-7 (20 µm). O inibidor foi reconstituído em água destilada e foi utilizado como controle o meio low ou meio high puros. O inibidor ML-7 foi reconstituído com DMSO, portanto, utilizou-se como grupo controle meio low ou high com DMSO. Os experimentos foram feitos no Centro de facilidade de Apoio à Pesquisa da USP (CEFAP-USP).

Ensaio de curva de crescimento: 1 x 10^3 células foram semeadas em placas recobertas com colágeno tipo I controle ou glicado (100 µg/ml). A cada 24 horas (24, 48 e 72 horas) as células foram tripsinizadas, ressuspensas em meio, diluídas em solução de Azul de Tripan (2 X) (corante vital) e as células vivas foram contadas em câmara de Neubauer.

Ensaio de tração do colágeno: este ensaio foi realizado pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas - IPT. As diferentes amostras de colágeno tipo I normal e glicado foram esticadas uniaxialmente, avaliando-se a velocidade de deslocamento entre a garra móvel de 5 mm/min. Utilizou-se os testes: ASTM D 3574:2011 Test E- Standard Test Methods for Flexible Cellular Materials - Slab, Bonded e Molded Urethane Foams-Tensile Test (IPT-CquiM-LTT-APB- PE 03.2.01), gerando uma deformação simétrica, utilizando uma máquina de ensaios de tração. No final desse ensaio, foram obtidos valores de tensão máxima e módulo de elasticidade.

Cobertura das esferas eletromagnéticas com peptídeos RGD: foram dissolvidos 10 mg de peptídeo RGD em DMSO na concentração final de 5 mg/ml. Para uso, foram preparados 1 mg (80 µl) de esferas eletromagnéticas com 4,5 µm de diâmetro. Foram realizadas duas lavagens com 1 ml PBS sob centrifugação máxima e uma lavagem com o mesmo volume de tampão carbonato. As esferas recobertas com RGD foram armazenadas em geladeira (4°C). O protocolo foi executado segundo o Laboratório de Microrreologia e Fisiologia Molecular do Instituto de Física-Universidade de São Paulo.

Ensaio de Citometria Óptica de Torção Magnética (OMTC): cerca de 1,5 X 10^4 células foram semeadas em placas de 96 poços removíveis sobre colágeno tipo I normal ou glicado, conforme citado anteriormente, durante 24h, quando atingiram confluência. Esferas eletromagnéticas recobertas com peptídeos RGD (suspensão 1 mg/ml) foram utilizadas na concentração de 10 µg/ml em cada poço, num volume de 100 µl de meio sem soro por 10 minutos. Posteriormente, a placa foi analisada no software OMTC segundo protocolo realizado no Laboratório Microreologia e Fisiologia Molecular-Instituto de Física-Universidade de São Paulo.

Ensaio de imunocitoquímica para alfa actina de músculo liso e integrina beta 1: as células foram semeadas em placas contendo lamínulas de vidro recobertas com os diferentes colágenos na concentração de 100 µg/ml e após 24 horas foram fixadas e permeabilizadas com paraformaldeido 4% contendo 0,5% Triton X-100 e 5% de sacarose em tampão PHEM por 5 minutos e pós-fixadas com paraformaldeido 4% em PHEM por 15 minutos. Após sucessivas lavagens com PHEM + glicina 100 mM as células foram bloqueadas com soro de cabra (NGS) 20% em PHEM + glicina por 1 hora. Após o bloqueio, foi incubado o anticorpo primário (mouse monoclonal anti-alpha actina de músculo liso, Sigma A2547, concentração 1:200 em tampão de bloqueio) por 1 hora em temperatura ambiente. Para beta 1 foi incubado o anticorpo primário conjugado com Alexa 488 (mouse anti- integrina beta 1, Abcam 23834, concentração 1:200 em tampão de bloqueio) por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas com PHEM +

glicina e coradas com faloidina-Rodamina (Molecular Probes) na concentração 1:700 por 1 hora e o núcleo com DAPI (Vectashield). Posteriormente, as lamínulas foram lavadas e montadas para posterior análise em microscopia confocal.

Imunocitoquímica para miosinas: As células foram semeadas em lamínulas cobertas com fibronectina (1 ug/ml) e após 24 horas foram fixadas com formaldeído 4% em PBS por 15 minutos. Posteriormente as células foram bloqueadas com NGS 5% e BSA 5% por 1 hora e incubadas com os anticorpos primários anti-MRLC, anti-MIIA, anti-MIIB (1:100 -*Cell Signaling*) por 16 h em solução de diluição (PBS-Triton X-100 0.3%/BSA 5%). Após sucessivas lavagens, os anticorpos secundários (1:100 - cabra anti-IgG de coelho conjugado a Alexa 488) foram incubados por 2 horas e com faloidina-Rodamina (1:700). Os controles negativos foram realizados, omitindo-se o anticorpo primário. A montagem foi feita com Vectashield contendo DAPI. As imagens foram adiquiridas em microscópio confocal Leica (TCS SP8 AOBS).

Western Blotting para Miosina IIA, IIB, MRLC e phosp MLC em lisado de células: 6 x 10^5 células foram semeadas em placa de Petri (100 mm de diâmetro) sobre cobertura de fibronectina (1µg/ml) e incubadas por 24 h, quando atingiram a confluência. Posteriormente, as células foram tripsinizadas e ao pellet foram adicionados 70 µl de tampão de lise (IGEPAL 1%, Tris HCl 10 µM pH 7.4, NaCl 0.1 M, ATP 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, 10% Inibidor de protease, 10% coquetel de inibidores de fosfatase 2 e 3) seguida de homogeneização 20X em seringa de insulina no gelo. Em seguida, as amostras ficaram sob agitação constante a 4 °C por 30 minutos, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford. Aproximadamente 30 µg de proteína foram aplicados em cada poço do gel de poliacrilamida em gradiente (SDS-PAGE) 4-20%, e as amostras submetidas à eletroforese com voltagem fixa 120 V por 2 horas, seguida de transferência em sistema semi-úmido com voltagem constante de 20 V por 45 minutos. As proteínas transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0.45 µm) foram bloqueadas com leite desnatado 5 % ouNGS 20% em TBS-T (Tris-Base 1 M, NaCl 3 M e Triton X-100 0.1%) por 2 horas à temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram incubados em solução TBS-T 0.1% com BSA 5%

na concentração 1:500 para anti-MIIA, anti-MIIB, anti-MRLC, anti-phospMLC (*Cell Signaling*) e 1:1000 anti-β-actina (Sigma) durante 16 h a 4°C. O reconhecimento deste complexo foi efetuado por anticorpos secundários conjugados à peroxidase (1:1000 cabra anti-IgG de coelho, Bio Rad, para β-actina) e 1:5000 (Anti-coelho IgG-HRP, Cell Signaling, para miosinas) incubados em solução TBS-T 0.1% por 2 horas à temperatura ambiente. A reação foi revelada por quimioluminescência utilizando ECL e posterior exposição em fotodocumentador (BioDNR Bio-Imaging Systems Ltd. Jerusalem, Israel).

Microscopia de força de tração (TFM): Foram confeccionados géis de poliacrilamida contendo 5% acrilamida e 0.15% bis-acrilamida, contendo esferas fluorescentes (0.2 μm, Red fluorescent 580/605, Invitrogen) na diluição 1:40. Foi realizada a cobertura com fibronectina conforme descrito acima e as células foram semeadas sobre essa matriz, sobre a qual aderiram por 4-5 horas. Em seguida foi adicionada tripsina 1 X e após 10 minutos foram adquiridas imagens das *beads* em microscópio confocal (Olympus Fluoview 1000, laser scanning confocal microscope com a UPlanSApo 603 (1.20 NA). Imagens foram obtidas em objetiva de imersão em água (63 X) equipada com controle de temperatura. Amostras foram excitadas em laser 543 nm, para excitação das esferas. Posteriormente, em imagens sequenciais, tripsina foi utilizada para soltar as células e novas imagens foram adquiridas. O padrão de análise do algoritmo foi padronizado segundo laboratório de migração celular do Dr. Allan Rick Horwitz na Universidade da Virginia.

Análises estatísticas: utilizamos o programa GraphPad Prism (versão 5.0). Test t de Student e ANOVA One-way (seguido por pós-teste de Tukey) foram utilizados para comparação. O nível de significância foi $P<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização da glicação in vitro do colágeno tipo I

A glicação *in vitro* é uma metodologia utilizada para mimetizar a glicação espontânea e aleatória que ocorre em doenças crônicas como no DM e, fisiologicamente, no envelhecimento. Trata-se de uma reação não enzimática que ocorre entre carbonilas de açúcares reduzidos e aminas livres de proteínas. Essa glicação pode ocorrer intracelularmente ou extracelularmente, alterando p. ex. proteínas do citoesqueleto e da MEC, foco de nosso estudo.

5.1.1 Detecção de AGEs totais

São utilizados na literatura diferentes agentes glicantes *in vitro*, que mimetizam a glicação *in vivo*, e os métodos variam com relação ao tempo e modo de glicação. Escolhemos para este estudo a glicação com o ácido glioxílico e cianoborohidreto de sódio. Para o controle da glicação incubamos o colágeno apenas com cianoborohidreto de sódio, que é o agente que catalisa a reação, mas que sozinho não é responsável por glicar o colágeno. A formação dos produtos de glicação avançada (AGEs) pode ser detectada por fluorimetria, pois alguns produtos formados são fluorescentes, como a pentosidina e AGES totais. Como padrões positivos, medimos por fluorimetria a albumina de pacientes diabéticos descompensados e controles e observamos aumento de AGEs totais nos pacientes diabéticos (10240,00 ± 75,70 *vs*. 40785,00 ± 267,00 média ± EPM; ***=p<0,0001) (Figura 12 A). Medimos a fluorescência do colágeno normal derivado da cauda do rato (não glicado), o colágeno apenas com cianoborohidreto (controle glicação) e do colágeno glicado com cianoborohidreto e ácido glioxílico (glicado). Os resultados apresentados no gráfico abaixo (Figura 12 B) mostram que o colágeno tratado com cianoborohidreto (controle glicação) não é semelhante ao colágeno não glicado e apresenta fluorescência significativamente aumentada em 5% (10768,00 ± 51,81 *vs*. 11290,00 ± 156,60 média ± EPM; *=p<0,05). Quando comparamos colágeno não glicado com glicado, podemos observar aumento nos valores de AGEs totais em 16% (11290,00 ±

156,60 *vs*. 13335,00 ± 94,65 média ± EPM; ***=p<0,05). Posteriormente verificamos que entre colágeno controle da glicação e glicado, houve aumento estatisticamente significante do colágeno glicado em 20% (10768,00 ± 51,81 *vs*. 13335,00 ± 94,65 média ± EPM; ***=p<0,05) (Figura 12B). Ainda, observamos que este colágeno possui propriedades alteradas, por isso, resolvemos utilizar o colágeno não glicado e o glicado para todos os ensaios.

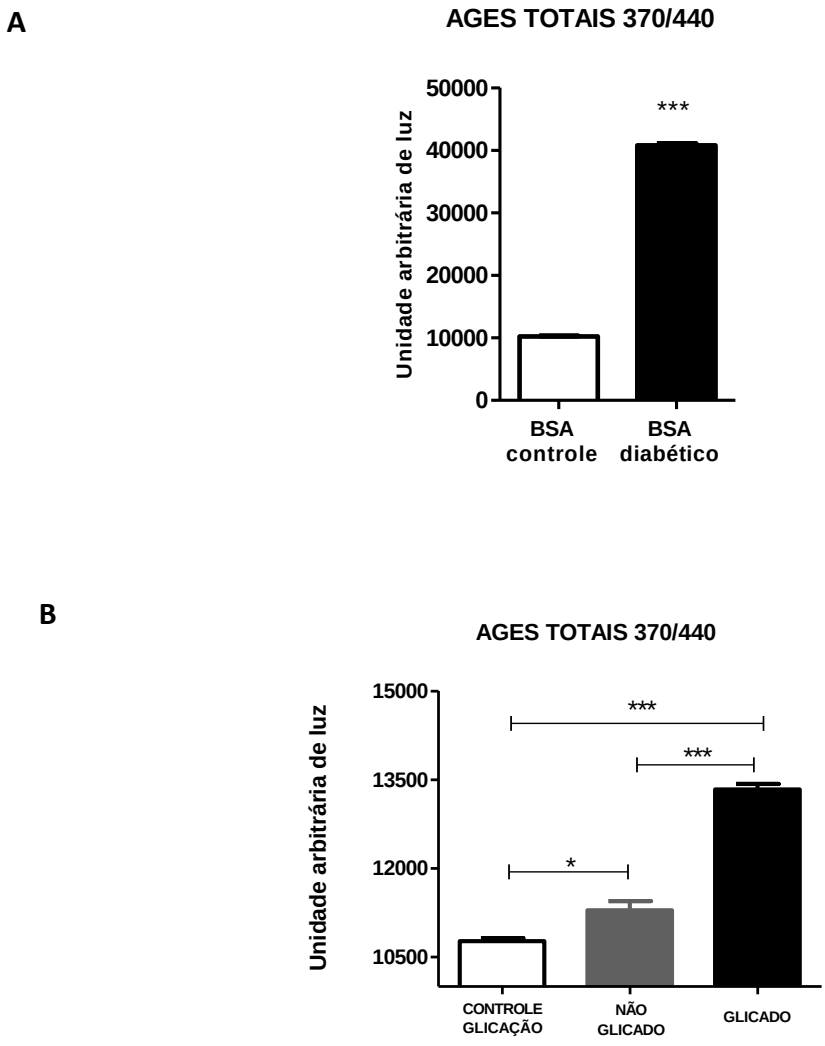


Figura 12- Medida da fluorescência emitida por AGES totais presentes nas amostras sob comprimento de onda de excitação de 370 nm e emissão de 440 nm. A) Amostras de albumina sérica de pacientes controle e albumina sérica de pacientes diabéticos. Valores estatísticos segundo Anova e pós-teste de Tukey. p< 0,0001. BSA=Albumina. B) Amostras de colágeno controle, não glicado e glicado. Valores estatísticos segundo Anova e pós-teste de Tukey. p< 0,05.

5.1.2 Ensaio de detecção de Aminas livres

Outro ensaio utilizado na literatura para a confirmação da glicação *in vitro* é o de detecção de aminas livres, resultantes da formação de ligações cruzadas entre aminas livres e carbonilas reduzidas. Quando há na amostra detectada mais aminas livres significa que não houve tanta ligação com carbonilas reduzidas, resultante então de pouca glicação. Assim, nas amostras de colágeno não glicado espera-se ter mais aminas livres, enquanto que nas amostras de colágeno glicado espera-se ter menos aminas livres. O resultado abaixo mostra que o colágeno glicado possui menos aminas livres detectadas (42 %) comparado com colágeno não-glicado (1,42 ± 0,006 vs. 2,44 ± 0,008 média ± EPM***=p<0,0001) (Figura 13).

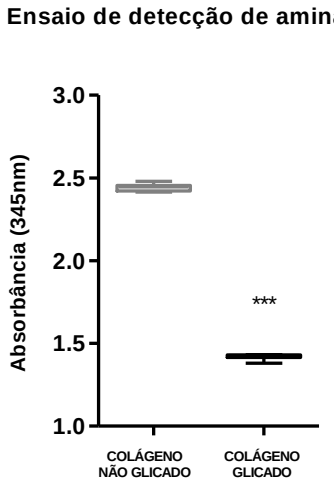


Figura 13- Medida de aminas livres presentes nas amostras sob comprimento de onda de absorção de 345 nm. Valores estatísticos segundo teste t de Student, sendo ***p< 0,0001.

5.1.3 Organização das fibras de colágeno tipo I em gel tridimensional avaliada por Second Harmonic Generation (SHG)

Com o objetivo de avaliar a organização das fibras de colágeno tipo I em gel tridimensional, analisamos géis compostos de colágeno tipo I normal (não glicado) e glicado in vitro em microscópio confocal multifoton utilizando a detecção de *second harmonic generation* (SHG), que permite a observação de estruturas anisotrópicas como o colágeno. Essas imagens podem ser empregadas para diferir simultaneamente as amostras quanto à organização estrutural das fibras nos diferentes géis. Podemos observar que as fibras de colágeno tipo I do gel de colágeno glicado (Figura 14 B), apresentam uma maior presença de grumos (setas), quando comparados com a imagem do colágeno não glicado (Figura 14 A), que apresenta uma organização mais homogênea. Sugere-se que este aspecto seja resultado do aumento de ligações cruzadas em amostras que sofreram glicação.

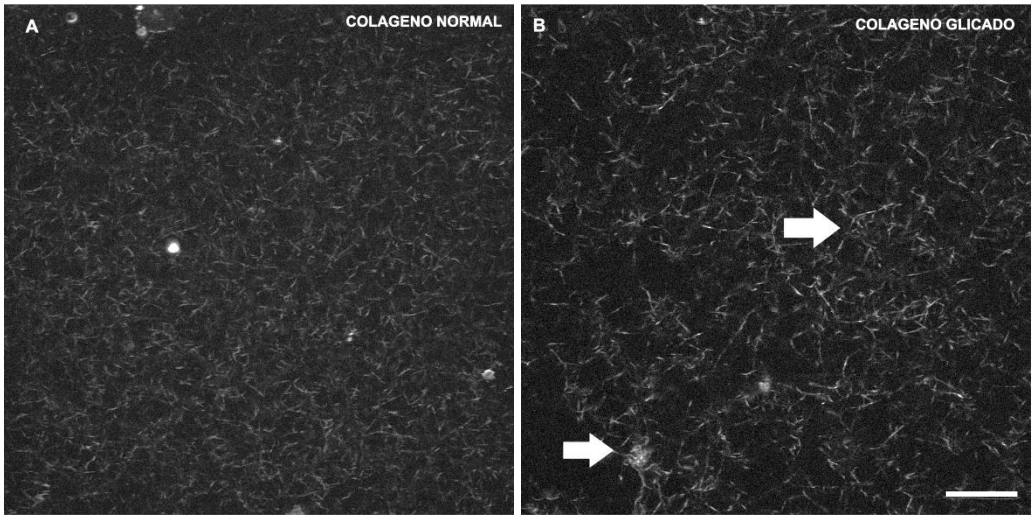


Figura 14- Imagem obtida por geração de segundo harmônica (SHG) por microscopia multifotônica em gel de colágeno normal (A) e colágeno glicado (B) Setas apontam regiões condensadas no colágeno glicado. Objetivo 63X. Barra= 20µm.

5.1.4 Colágeno tipo I glicado in vitro apresenta resistência à tração (tensão máxima e módulo de elasticidade) menor do que o colágeno controle

Com a finalidade de medir algumas propriedades mecânicas do colágeno tipo I normal e glicado, foi realizado ensaio de resistência à tração. Amostras de colágeno tipo I normal e glicado foram submetidas à liofilização e adquiriram características flexíveis, o que permitiu a realização do ensaio de resistência à tração. A observação macroscópica do colágeno glicado liofilizado mostrou diferenças na sua estrutura, com aparência menos uniforme no tamanho e na forma quando comparado com o colágeno normal (Figura 15). Posteriormente, as amostras foram tracionadas uniaxialmente até a sua ruptura. A velocidade de deslocamento da garra móvel foi de 5 mm/min.

Os resultados mostram que houve uma redução na resistência à ruptura da amostra de colágeno glicado, quando comparado com o colágeno normal (6,10 ± 0,69 *vs.* 1,02 ± 0,07 kPa, média ± EPM **p<0,0005) (Figura 16 A). Esses resultados mostram que o amostra de colágeno glicado possui uma menor capacidade de suportar a tração exercida uniaxialmente antes de romper-se. Evidências da literatura mostram que as alterações nas propriedades mecânicas causadas pela glicação em fibras de colágeno traduzem-se em aumento da rigidez, levando a um tecido mais quebradiço, comprometendo seu funcionamento adequado (LIAO et al*.,* 2009).

Observamos também uma redução no módulo de elasticidade ou módulo de Young em colágeno glicado quando comparado com colágeno normal (72,46 ± 4,0 *vs.* 3,50 ± 1,46 kPa, média ± EPM **p<0,0005) (Figura 16 B). O módulo de elasticidade é uma grandeza proporcional à rigidez de um material quando este é submetido à tensão extrema de tração. É a razão entre a tensão aplicada e a deformação sofrida pelo corpo de prova. Observamos que o módulo de elasticidade do colágeno normal é muito maior do que o módulo de elasticidade do colágeno glicado. Assim, quanto menor o módulo, mais rígido é o material. É importante ressaltar que esta análise foi realizada em amostras liofilizadas, e não em colágeno reconstituído (gel).

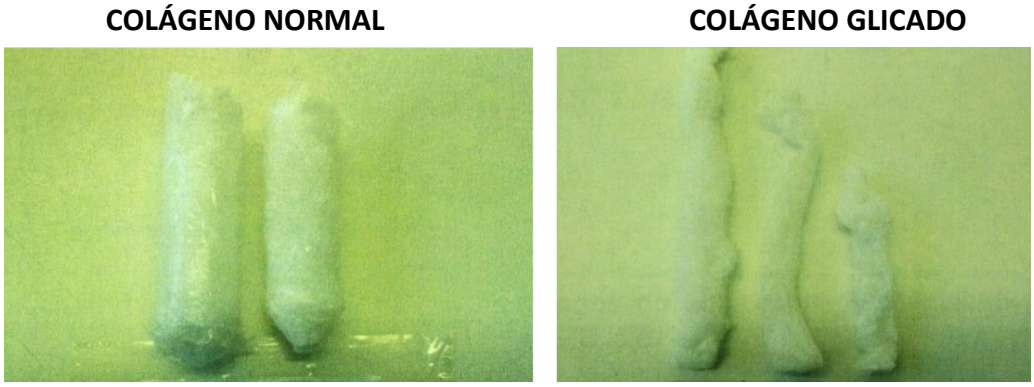


Figura 15- Imagem dos corpos de prova para o ensaio de tração. Para o ensaio de tração as amostras foram cortadas no mesmo tamanho (3mm) para que a garra do equipamento tivesse o mesmo comprimento inicial para realizar as medidas.

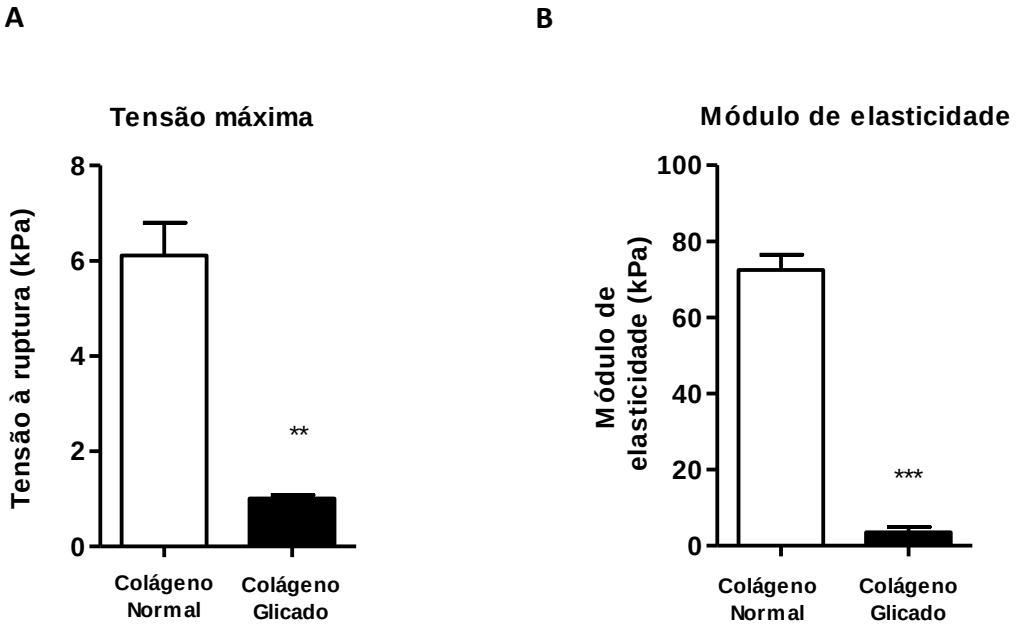


Figura 16-Ensaio de resistência à tração. Colágeno normal e glicado foram submetidos à mesma velocidade de deslocamento da garra móvel (5mm/min). (A) Os resultados são expressos em kPa, pois mostram a tensão máxima que o corpo de prova suporta até sua ruptura total. Análise estatística utilizando test t de Student, com **p<0,005. (B) Os resultados de resistência à tração expressando o módulo de elasticidade, que é a razão entre a tensão exercida e a deformação sofrida pelo material. Também são expressos em KPa. Análise estatística utilizando test t de Student, com ***p<0,0005.

5.2 Ensaios biológicos com colágeno tipo I normal e glicado em fibroblastos derivados de ratos controles (C) e diabéticos (D)

5.2.1 Crescimento celular sobre colágeno normal e glicado

Os fibroblastos utilizados nesta etapa do trabalho foram obtidos de ratos controle (C) e diabéticos (D), mantidos em condições de cultura em meio controle (glicose 5mM) para fibroblastos C ou com alta concentração de glicose (30 mM) para D.

A curva de crescimento foi realizada por 3 dias, com contagens a cada 24 horas. As células (1 x 10^3) foram, portanto, semeadas sobre 100 µg/ml de colágeno normal (CN) ou colágeno glicado (CG) por 24, 48 e 72 horas. Quando comparamos as células C e D sobre colágeno normal, não observamos diferenças significativas entre os grupos mesmo após 72 h (respectivamente 7467 ± 1920 *vs*. 4133 ± 1090, média ± EPM), embora haja uma tendência de redução da proliferação em D (Figura 17). Frente ao colágeno glicado as células D apresentaram uma redução de 46% no crescimento durante o ensaio, sendo esta diferença estatisticamente significativa após 72 horas (5400 ± 400 *vs.* 2900 ± 400, média ± EPM, * P<0,0001). É importante mencionar que o colágeno glicado não alterou a viabilidade celular, uma vez que a contagem de células na presença do corante vital Azul de Tripan não evidenciou morte celular.

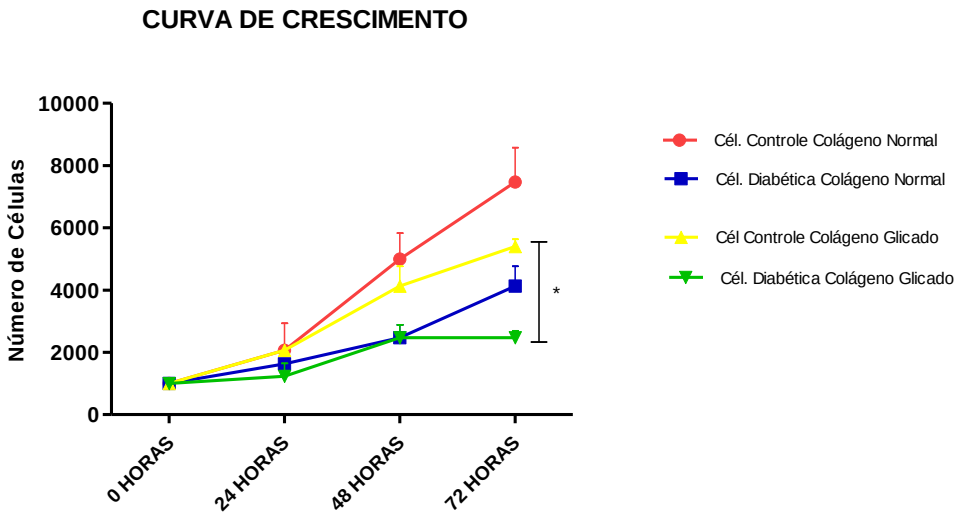


Figura 17- Ensaio de curva de crescimento sobre colágeno normal (não glicado) e sobre colágeno glicado. As células derivadas de ratos controle e diabéticos foram semeadas sobre 100 µg/ml de colágeno por 24, 48 ou 72 horas. *p<0,0001, segundo Anova One way e pós-teste de Tukey.

5.2.2 Espraiamento celular e arranjo do citoesqueleto de actina sobre colágeno normal e glicado

As células C e D foram semeadas sobre lamínulas de vidro previamente cobertas com 100 µg/ml de colágeno normal ou glicado e incubadas por 1 hora. Após fixação e evidenciação de F-actina, avaliamos o espraiamento celular e o citoesqueleto de actina. As células C e D não mostraram diferenças morfológicas sobre o colágeno normal, apresentando corpo celular arredondado e com pequenos filopódios (Figura 18 A e B). O colágeno glicado dificultou o espraiamento tanto de células C quanto de células D, que se mostraram pequenas e arredondadas (Figura 18 C e D). Sendo assim, o efeito do colágeno glicado em 1 hora foi semelhante sobre células C e D. A área das células aderidas foi medida utilizando-se o programa Image J (NIH), comprovando esta redução no espraiamento sobre colágeno glicado: área de 1.288,00 ± 122,90 *vs*. 538,40 ± 92,84 μm^2 (média ± EPM, *** P<0,005) para células C e de 1089,00 ± 149,90 *vs*. 359,20 ± 56,81 μm^2 (média ± EPM, **, P<0.005 para células diabéticas (Figura 19).

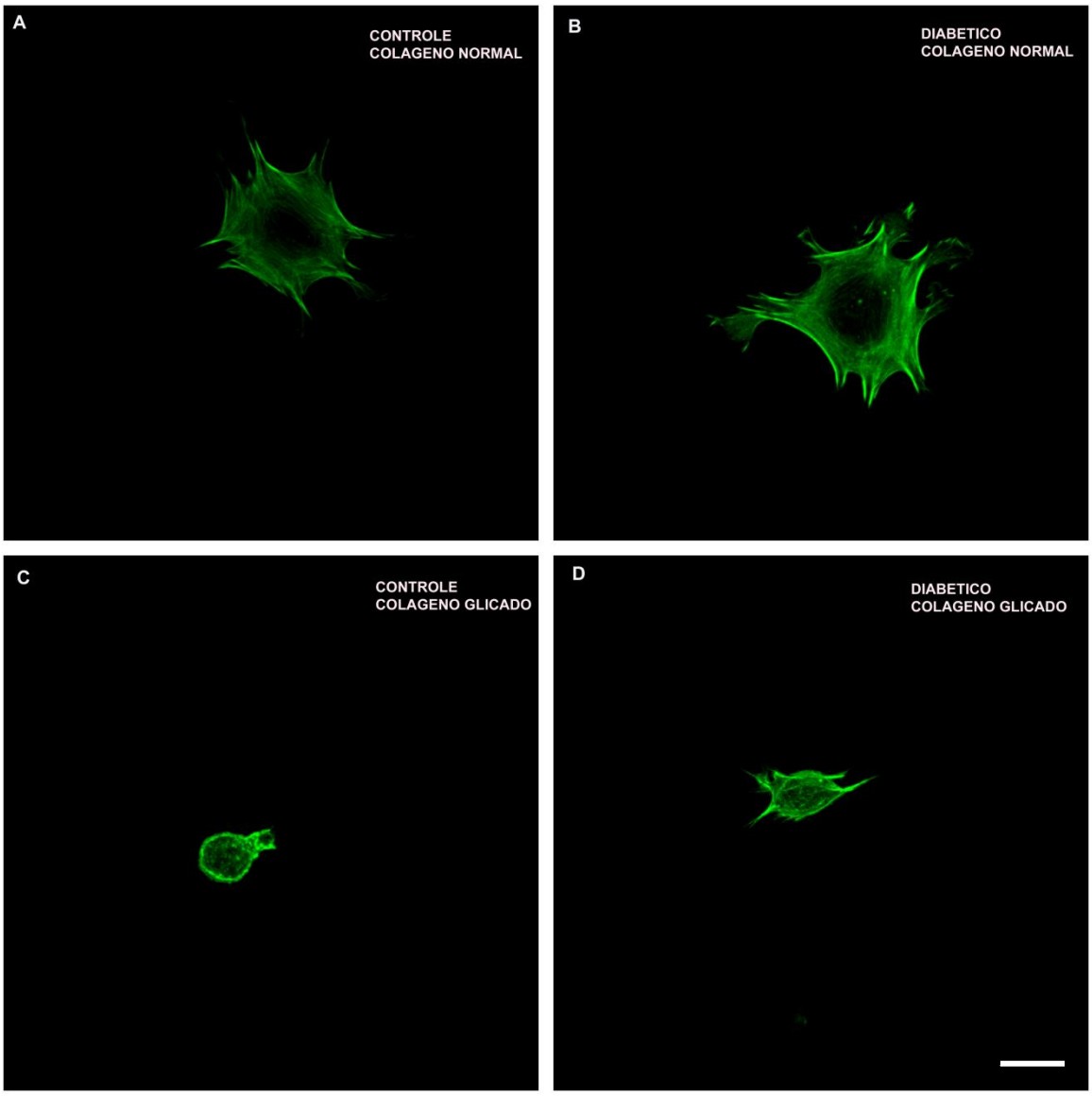


Figura 18- Espraiamento celular após 1 hora. (A) Fibroblastos derivados de ratos controle sobre colágeno normal; (B) Fibroblastos derivados de ratos diabéticos sobre colágeno normal; (C) Fibroblastos derivados de ratos controle sobre colágeno glicado e (D) Fibroblastos derivados de ratos diabéticos sobre colágeno glicado. Objetiva de 63X. Verde= F-actina evidenciada com faloidina-Alexa 488. Barra= 50µm.

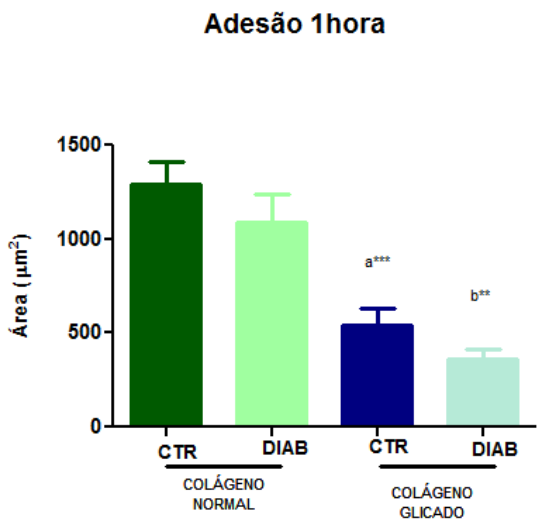


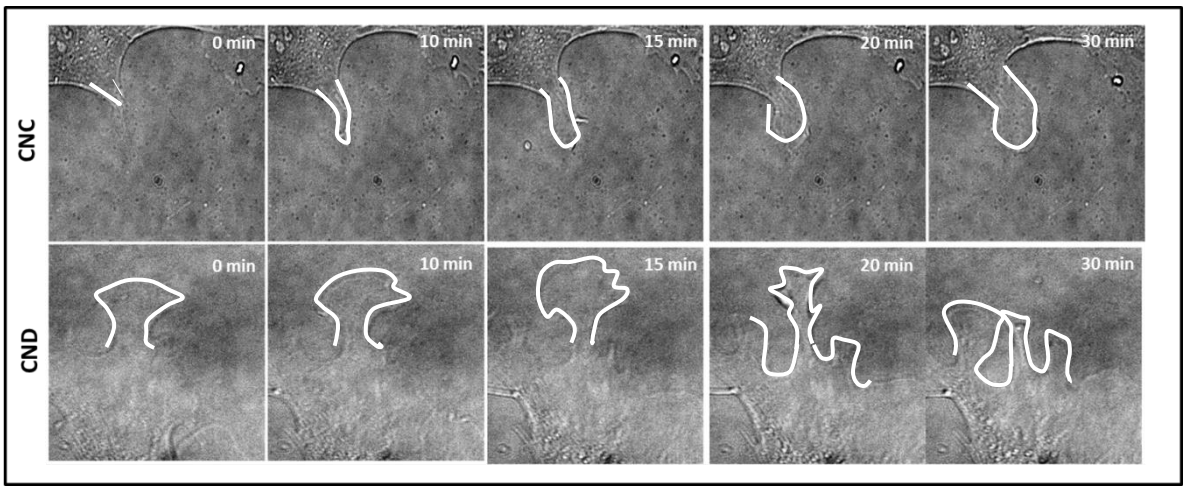
Figura 19- Área do espraiamento celular após 1 hora. Células derivadas de ratos controle (CTR) e diabéticos (DIAB) sobre colágeno normal e glicado. Análise estatística segundo Anova One way e pós-teste de Tukey ($p<0,005$). N=25 células por grupo. a*** = diferença significativa entre CTR colágeno normal e CTR colágeno glicado, b**= diferença significativa entre DIAB colágeno normal e DIAB colágeno glicado.

5.2.3 A glicação do colágeno altera o perfil de formação de protrusões de fibroblastos derivados de ratos controle (C) e diabéticos (D)

Durante o processo de migração, as células necessitam emitir a protrusão em direção ao movimento para em seguida realizar a adesão ao substrato. Para avaliar o efeito da glicação sobre a formação de protrusões, foram realizados filmes curtos (30 minutos) com intervalos de 45 segundos e posteriormente foram montados painéis com imagens sequenciais, onde foi traçada a dinâmica de formação dos lamelipódios. As análises qualitativas revelam que células D em colágeno normal formam protrusões que se ramificam, enquanto que células C tendem a formar uma protrusão única ao longo do tempo (Figura 20 A). De forma interessante, ao analisarmos os vídeos de células C e D sobre o colágeno glicado, foi possível observar que os fibroblastos C apresentavam ainda a formação de um lamelipódio único, porém, com um tamanho aparentemente menor. E o lamelipódio do fibroblasto D apresentou múltiplos processos, que permaneceram

múltiplos ao longo de todo o filme (Figura 20 B). Estes resultados sugerem uma menor dinâmica na formação das protrusões.

A



B

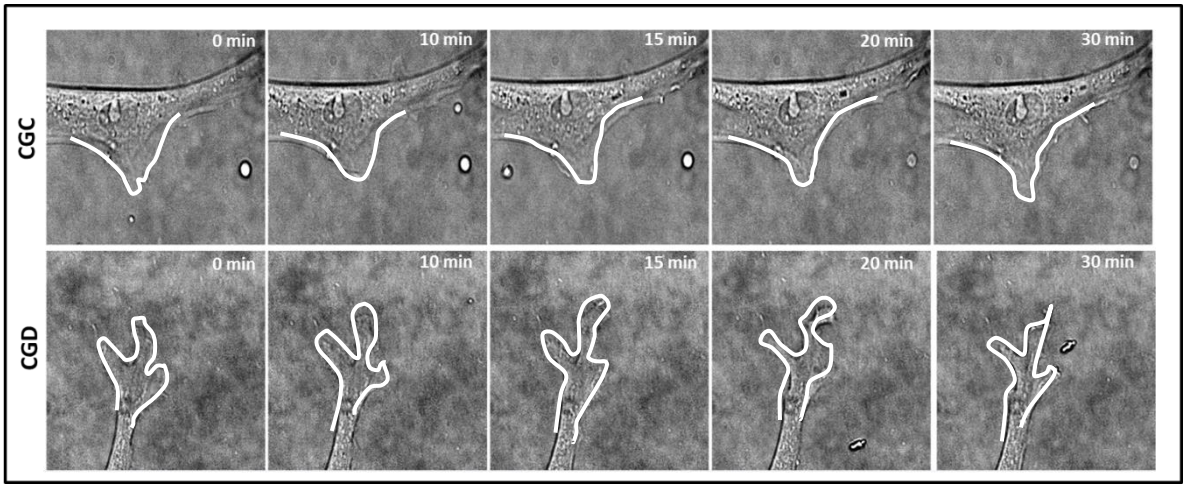


Figura 20- Análise da dinâmica de formação de protrusão ao longo de 30 minutos. (A) CNC= Fibroblastos derivados de ratos controles sobre colágeno normal e CND= Fibroblastos derivados de ratos diabéticos sobre colágeno normal. (B) CGC= Fibroblastos derivados de ratos controle sobre colágeno glicado e CGD= Fibroblastos derivados de ratos diabéticos sobre colágeno glicado. As imagens foram capturadas a cada 45 segundos, num intervalo de 30 minutos. Objetiva 40X. Zoom manual e contorno do lamelipódio realizado com Image J.

5.2.4 A glicação não altera a morfologia de fibroblastos derivados de ratos controles (C) e diabéticos (D)

A análise do citoesqueleto de actina 24 h após o plaqueamento mostrou que os fibroblastos C e D apresentaram-se com morfologia bem semelhante em todos os substratos (Figura 21), com fibras de estresse bem evidentes (resultado não apresentado). Esta morfologia é compatível com de células com uma contratilidade aumentada, associada a uma ativação da proteína Rho A. Quando realizamos a medida da área que as células apresentavam quando em contato com diferentes substratos, não foi observada diferença (Figura 22).

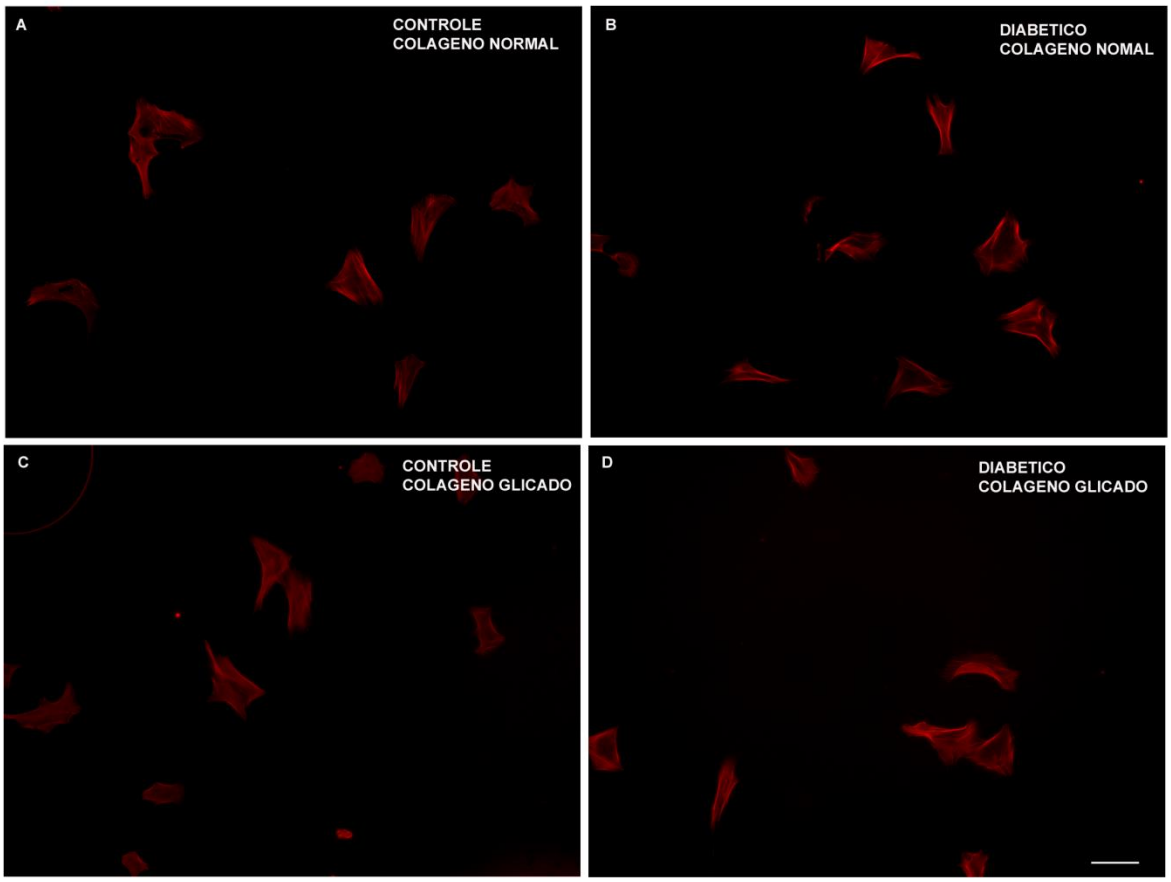


Figura 21- Análise do citoesqueleto de actina após 24 horas de plaqueamento em aumento de 10X. (A) Célula C sobre colágeno normal; (B) Célula D sobre colágeno normal; (C) Célula C sobre colágeno glicado e (D) Célula D sobre colágeno glicado. Vermelho=F-actina. Barra= 100µm

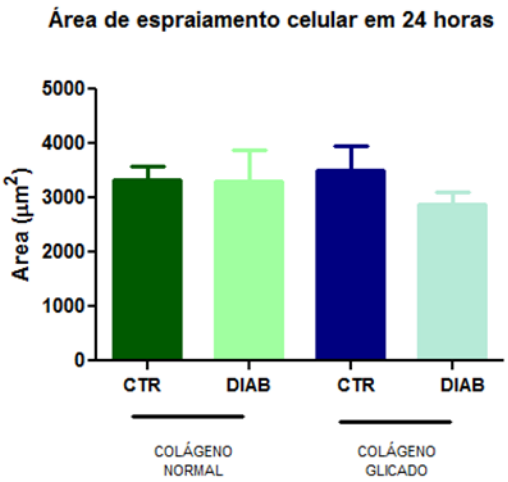


Figura 22- Área do espraiamento celular após 24 horas de plaqueamento. A área das células foi medida através do software Image J. n=20 células por grupo.

5.2.5 Efeitos da glicação sobre a distribuição e expressão de alfa actina de músculo liso (α-SMA)

Embora a distribuição de F-actina e espraiamento celular após 24 horas tenham sido semelhantes em células C e D nos diferentes substratos, houve uma diferença na expressão de α-actina de músculo liso (α-SMA) em resposta ao diabetes. Sobre o colágeno normal, células C apresentaram imunomarcação difusa para α-SMA, distribuída por todo o corpo celular e, algumas vezes, em sobreposição com fibras de estresse (Figura 23 A-C). Este padrão de distribuição foi também observado em células D, mas de forma mais intensa (Figura 23 D-F). Células C em colágeno glicado apresentaram uma distribuição de α-SMA na região central do corpo celular e pouco associada com fibras de estresse (figura 24 A-C). Já as células D em colágeno glicado, apresentaram uma forte marcação de α-SMA associada com as fibras de estresse, sendo esta marcação mais evidente do que os outros grupos comparativos (Figura 24 D-F).

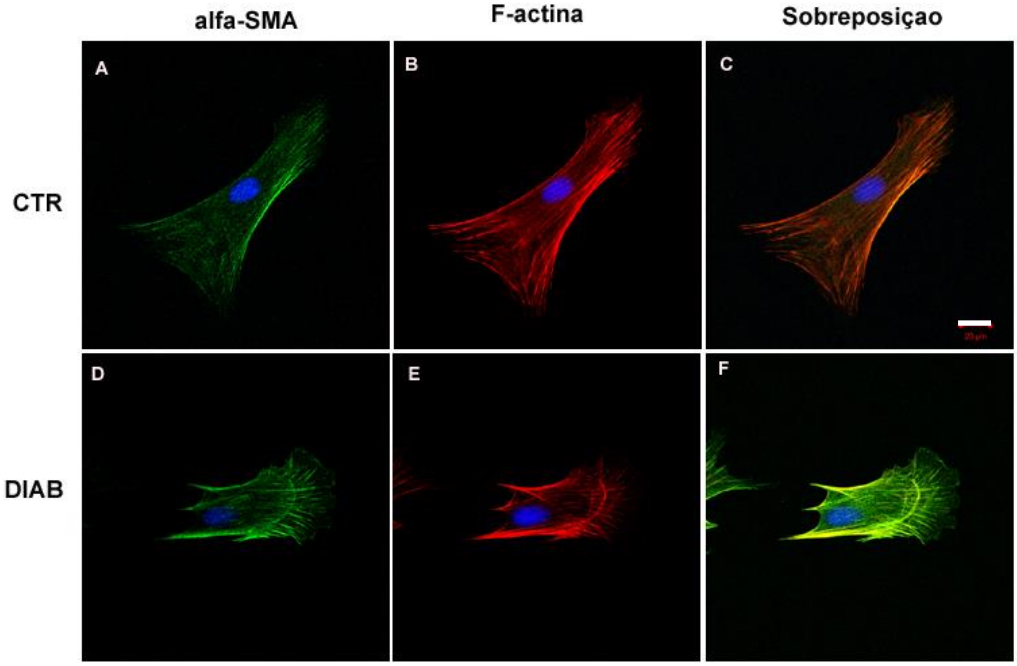


Figura 23- Imunofluorescência para α-SMA em colágeno normal. Células C sobre colágeno normal (A-C) e células D sobre colágeno normal (D-F). (A e D) Verde: anticorpo primário anti- α-SMA; (B e E) Vermelho=F- actina; (C e F) Azul= núcleo. Objetiva 63X. Barra= 20µm

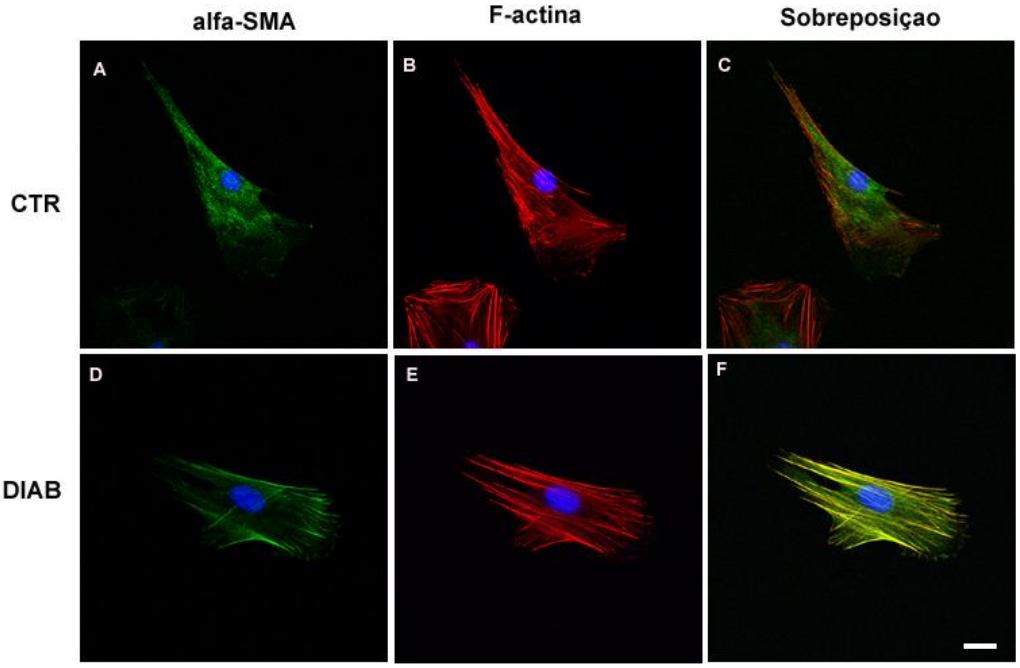


Figura 24- Imunofluorescência para α-SMA em colágeno glicado. Células C sobre colágeno glicado (A-C) e células D sobre colágeno glicado (D-F). (A e D) Verde: anticorpo primário anti- α-SMA; (B e E) Vermelho=F- actina; (C e F) Azul= núcleo. Objetiva 63X. Barra= 20µm.

5.2.6 Glicação do colágeno afeta o comportamento migratório de fibroblastos derivados de ratos controles e diabéticos

O ensaio de migração em time-lapse analisa o perfil migratório de células individuais, fornecendo resultados de velocidade, direcionalidade e distância percorrida relativa. As células C e D foram semeadas sobre os diferentes substratos por 18 horas. Após esse período, as células foram analisadas no microscópio sob condições de temperatura e atmosfera adequadas durante 24 horas adicionais. Conforme esperado, sobre o colágeno normal as células D apresentaram uma redução de 44% na velocidade de migração quando comparadas às células C (43,89 ± 4,07 *vs.* 24,86 ± 1,96 µm/h ***, média ± EPM, $p<0,0001$). Sobre o colágeno glicado as células D praticamente não se deslocam, apesar de se movimentarem, quando comparadas às células C (Figura 29).

Nestas condições a velocidade de migração das células C foi reduzida pela glicação do colágeno em 63% (43,89 ± 4,07 *vs.* 16,52 ± 2,9 µm/h, *** média ± EPM, p<0,0001) (Figura 25), enquanto a velocidade de migração das células D foi reduzida em 44% pela glicação (24,86 ± 1,96 *vs.* 13,96 ± 1,42 µm/h, * média ± EPM, p<0,0001) (Figura 25). A trajetória das células mostrou que células diabéticas sobre colágeno glicado realizaram deslocamento menor comparado com todas as células dos outros grupos (Figura 26).

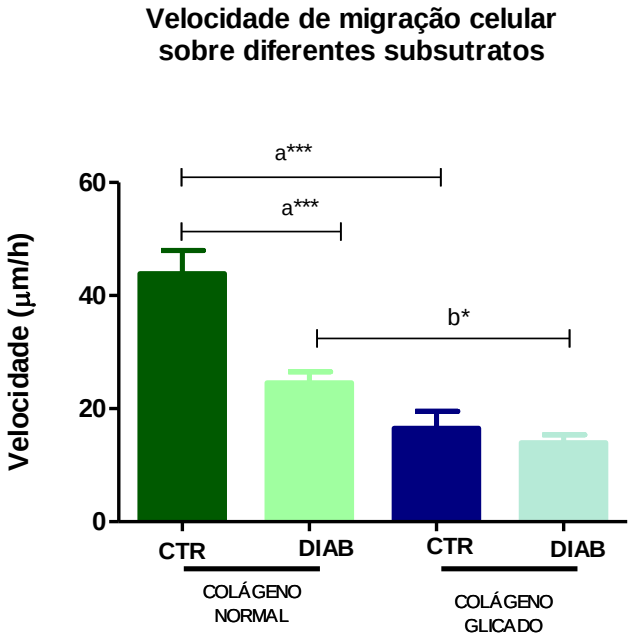


Figura 25- Velocidade de migração em time-lapse. Células derivadas de ratos controle (CTR) ou diabéticos (DIAB) foram semeadas sobre 100 µg/ml de colágeno normal ou colágeno glicado. As células foram monitoradas por 24 h e posteriormente analisadas para a determinação da velocidade média. Valores em porcentagem expressam a redução da velocidade de migração entre os grupos que apresentaram diferença estaticamente significativa. Valores estatísticos com p<0.0001, segundo Anova e pós-teste de Tukey. N= 63 células por grupo.

Trajetória de migração celular sobre diferentes substratos

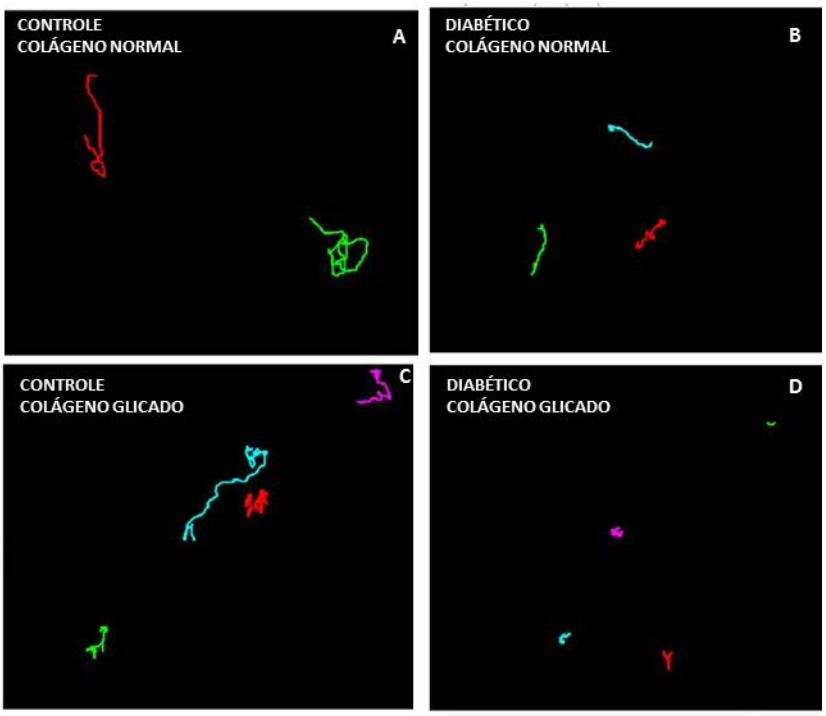


Figura 26- Trajetória da célula em ensaio de migração em time-lapse. Células derivadas de ratos controle (C) ou diabéticos (D) foram semeadas sobre 100 µg/ml de colágeno normal ou colágeno glicado. As células foram monitoradas por 24 h e posteriormente analisadas individualmente. Cada linha mostra a trajetória de uma célula. (A) Células CTR sobre colágeno normal; (B) Células CTR sobre colágeno glicado; (C) Células DIAB sobre colágeno normal e (D) Células DIAB sobre colágeno glicado.

Além da velocidade de migração, obtivemos valores de direcionalidade e distância relativa (menor distância entre o ponto de partida e o ponto final das células). A direcionalidade não foi alterada pela glicação nem pela condição de diabetes (Figura 27 A). Já a distância relativa mostrou-se diferente entre os grupos: sobre colágeno normal as células D tiveram esta distância reduzida em 44% quando comparadas às células C (361,4 ± 28,26 *vs*. 203,00 ± 18,51 µm, *** média ± EPM, p<0,0001); sobre o colágeno glicado a diferença entre células C e D não foi significativa, em torno de 28% apenas (126 ± 12,95 *vs*. 90,45 ± 8,9 µm, média ± EPM). A glicação exerceu um efeito maior sobre células C, com

redução de 65% da distância (361,40 ± 28,26 *vs*. 126,00 ± 12,95 µm, *** média ± EPM, p<0,0001). Células D, por sua vez, apresentaram redução de 55% na distância relativa frente ao colágeno glicado (203,70 ± 18,51 *vs*. 90,45 ± 8,90 µm, *** média ± EPM, p<0,0001) (Figura 27 B).

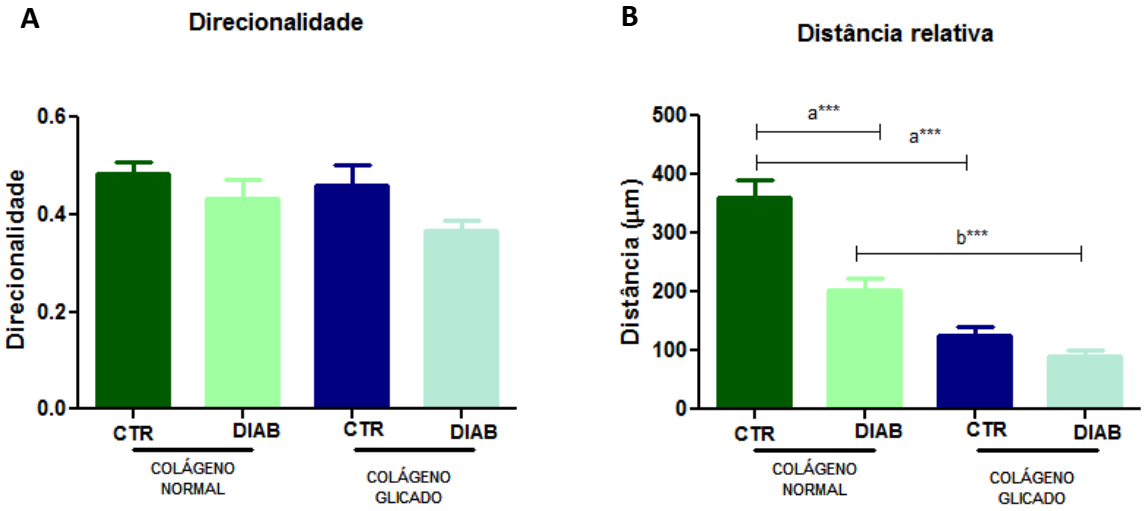


Figura 27- Análises da migração de fibroblastos derivados de ratos controle (CTR) e diabéticos (DIAB). (A) Direcionalidade celular, mediada pela razão entre a distância relativa/distância total percorrida. (B) Distância relativa (menor distância entre o início e o final da trajetória). Valores com diferença estatística com p<0.0001, segundo Anova e pós-teste de Tukey. N= 63 células por grupo.

5.2.7 Glicação altera a distribuição da subunidade de integrina β1

Ainda com o objetivo de entender alguns dos fenômenos que ocorrem em células C e D frente ao colágeno glicado, resolvemos avaliar a distribuição de integrinas contendo a subunidade β1 por imunofluorescência. Os resultados mostram que as adesões contendo β1 estão presentes em células C sobre colágeno normal e glicado (Figura 28 A e C), assim como em células D sobre o colágeno normal (Figura 28 B). Células D sobre o colágeno glicado, por sua vez, apresentaram uma marcação em muito fraca para β1.

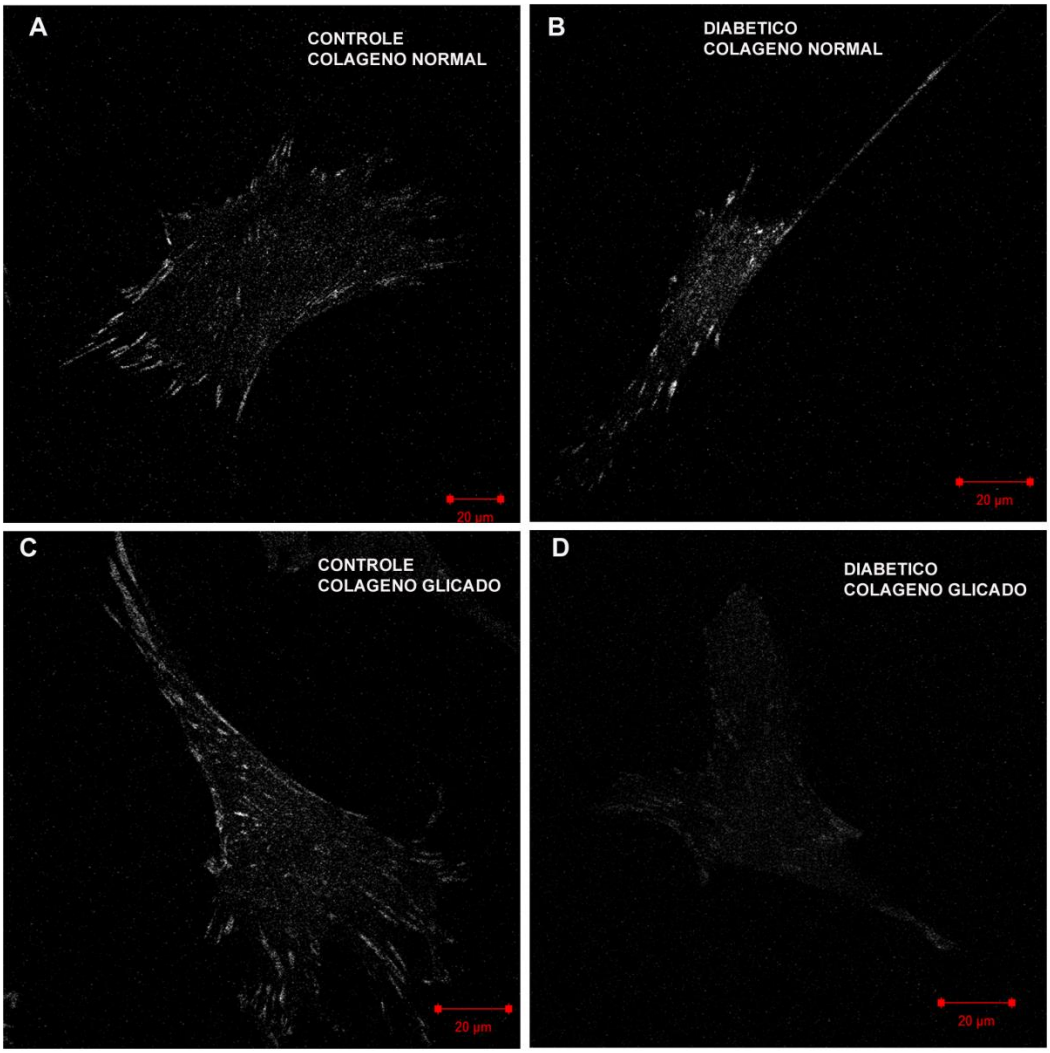


Figura 28- Imunofluorescência para integrina β1. (A) Célula C sobre colágeno normal, (B) célula D sobre colágeno normal, (C) Célula C sobre colágeno glicado e (D) Célula D sobre colágeno glicado. Objetiva 63 X. Barra= 20µm.

5.2.8 A glicação altera a rigidez e viscosidade do citoesqueleto

O ensaio de OMTC tem como objetivo quantificar as alterações nas propriedades elásticas e viscosas do citoesqueleto. Para a realização deste ensaio, microesferas eletromagnéticas são aderidas a fibroblastos dérmicos derivados de ratos controle (C) e diabéticos (D), semeados sobre colágeno normal ou glicado. Um campo eletromagnético uniforme é imposto sobre as microesferas magnetizadas e um pequeno torque é gerado,

resultando movimento na microesfera e tensão no esqueleto celular. Esse movimento forçado da microesfera é modulado pelas propriedades elásticas e viscosas do citoesqueleto, ocasionando um deslocamento diferenciado. Com campo magnético de 0,5 Hz, o software utilizado detectou em cada campo do microscópio cerca de 100 microesferas, que foram acompanhadas simultaneamente durante a aplicação do campo magnético, gerando os resultados (Figura 29). Observamos uma tendência de redução da rigidez e viscosidade do citoesqueleto de células D em comparação às células C, mas esta diferença foi estatisticamente significativa apenas frente ao colágeno glicado (1,42 ± 0,10 *vs*. 1,05 ± 0,07* Pa/nm, média ±EPM, $p<0,05$) (Figura 30). Para o cálculo utilizamos a média do módulo de armazenamento total (G=Gbsnl), que resulta na somatória de G' (que mede a resposta gerada pela rigidez do substrato, resultando na movimentação das microesferas) e G'' (que mede o deslocamento das microesferas resultante das características do citoplasma celular-viscosidade celular). As propriedades viscoelásticas do citoesqueleto de actina e miosina que o uso da técnica de OMTC nos permite avaliar são um reflexo da resposta às forças mecânicas exercidas no substrato. Sabe-se que essas forças mecânicas possuem papel central em processos biológicos como a citocinese e migração celular. A força que a célula exerce é dependente do substrato e suas características, bem como da integração das proteínas do citoesqueleto, integrinas e MEC.

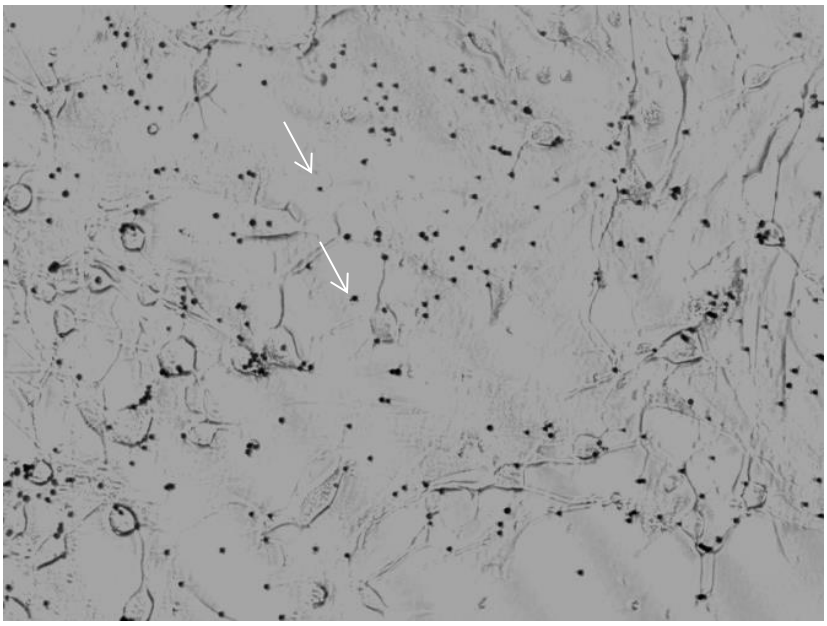


Figura 29- Imagem de cultura de fibroblastos dérmicos com microesferas eletromagnéticas aderidas. As microesferas selecionadas pelo software são analisadas e passadas por critérios de exclusão. Objetiva 20X.

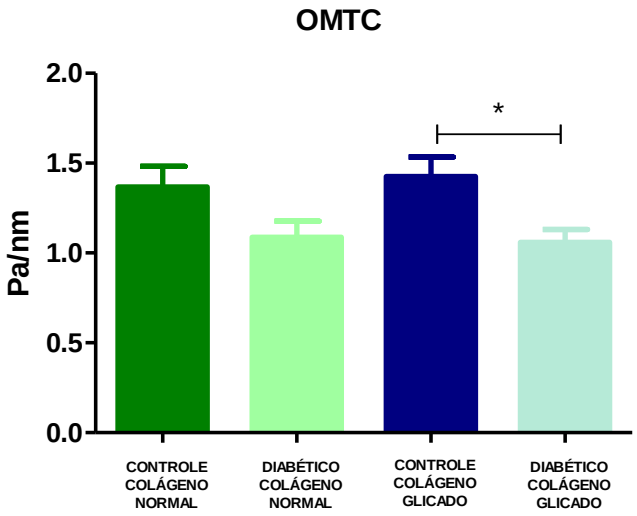
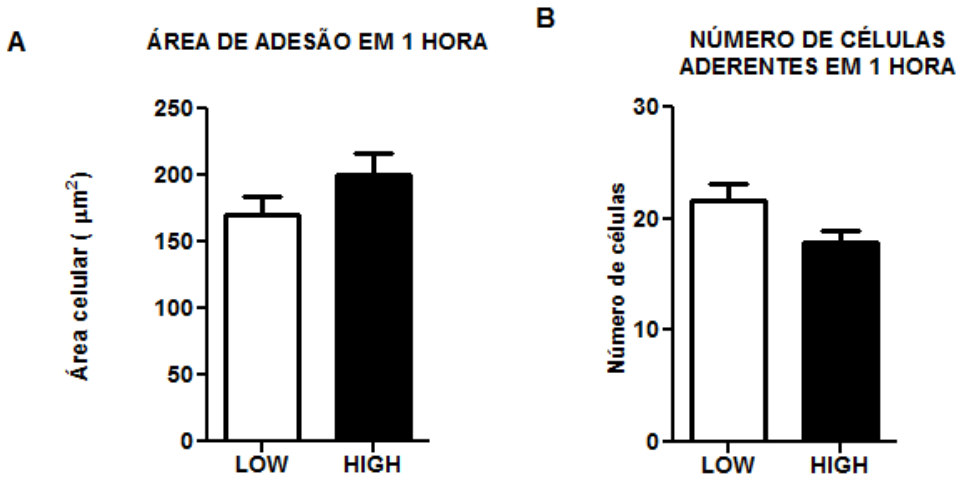


Figura 30- Ensaio de OMTC. Fibroblastos C e D foram semeados sobre colágeno normal e glicado e medidas de viscoelasticidade foram realizadas. Os resultados mostram uma diminuição da rigidez e viscosidade de fibroblastos D em colágeno glicado, quando comparados com fibroblastos em todas as outras condições comparativas. Análise estatística utilizando Anova One way e pós-teste de Tukey, com $p<0.05$.

5.3 Efeitos da elevada concentração de glicose sobre a contratilidade de fibroblastos NIH-3T3

5.3.1 Alta concentração de glicose não altera a área de espraiamento e o número de células aderidas ao substrato

Conforme já mencionado na introdução e demonstrado neste estudo, fibroblastos derivados de ratos diabéticos ou expostos in vitro a uma elevada concentração de glicose apresentam migração deficiente sobre fibronectina e colágeno I. Resultados anteriores obtidos por nosso grupo sugerem uma deficiência na contratilidade destas células (LAMERS et al., 2011; ALMEIDA, 2011). Para avaliar os efeitos da exposição a uma concentração elevada de glicose (30 mM) durante 15 dias sobre a contratilidade de fibroblastos, inicialmente realizamos o ensaio de adesão por 1 hora ao substrato de fibronectina (1 µg/ml). Após este período, as células aderidas foram fixadas e coradas com faloidina. As análises revelaram que não houve diferença na área de espraiamento das células, nem na quantidade de células que aderiram (Figura 31 A -D).



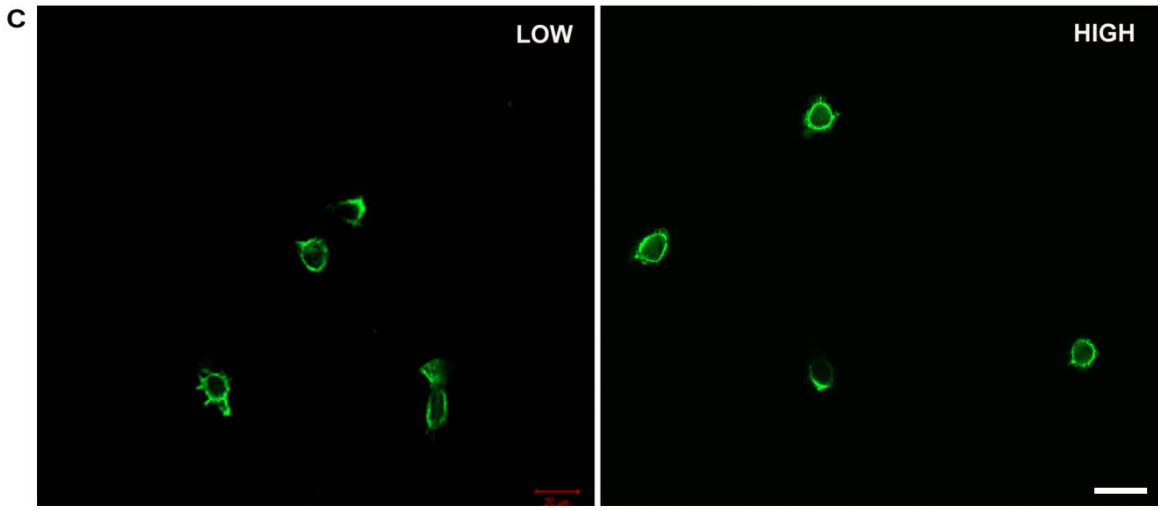


Figura 31- Ensaio de adesão de células NIH-3T3 cultivadas com glicose 5 mM (LOW) ou glicose 30 mM (HIGH) durante 15 dias em substrato de fibronectina 1 µg/ml por 1 hora. A) Área das células aderidas em μm^2. B) Número de células aderidas. C) Evidenciação do citoesqueleto de F-actina nestas células utilizando faloidina conjugada com Alexa-488. Imagens foram capturadas em 10 campos diferentes com objetiva de 10X. A medida da área das células e a contagem do número foram feitas com o software Image J. Barra=20 µm.

5.3.2 Células cultivadas em concentração elevada de glicose apresentam menos fibras de estresse que células controle

Os fibroblastos foram incubados por 24 horas para visualização do citoesqueleto de actina em células plenamente espraiadas e migratórias. As imagens revelaram que as células em meio HIGH (glicose 30 mM) apresentavam menos fibras de estresse quando comparadas com as células em meio LOW (glicose 5 mM). Observamos também que muitos fibroblastos em meio HIGH apresentavam uma cauda longa, aparentando uma dificuldade de retração da mesma (Figura 32). Ao realizarmos a medida da área de espraiamento das células, não observamos diferenças entre os tratamentos (Figura 33).

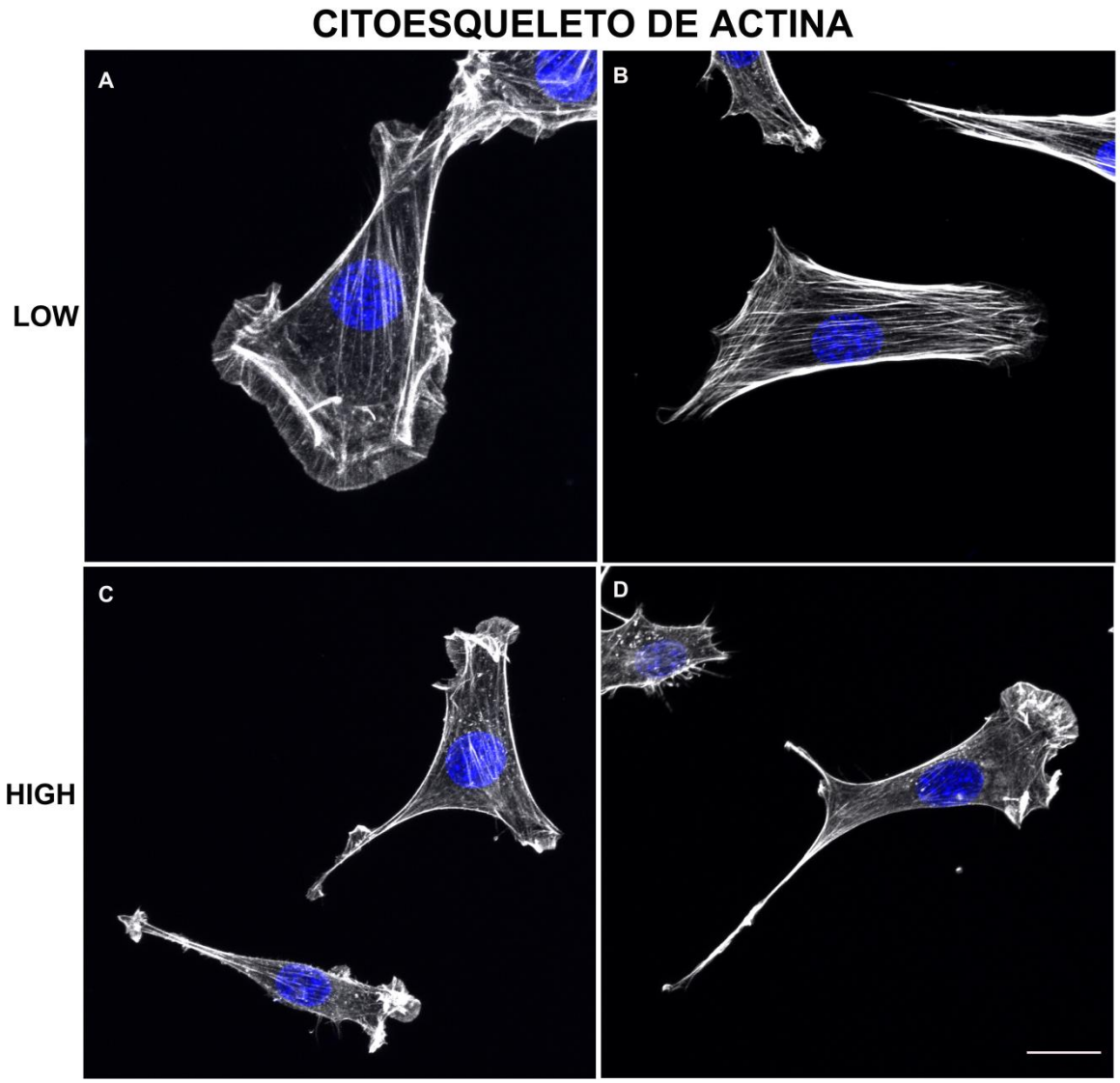


Figura 32- Citoesqueleto de actina corado com faloidina conjugada com Alexa-488. Células LOW (A e B) e HIGH (C e D) foram semeadas sobre fibronectina (1 µg/ml) durante 24 horas. Branco (F-actina) e azul (núcleo). Objetiva de 63 X. Barra= 10µm.

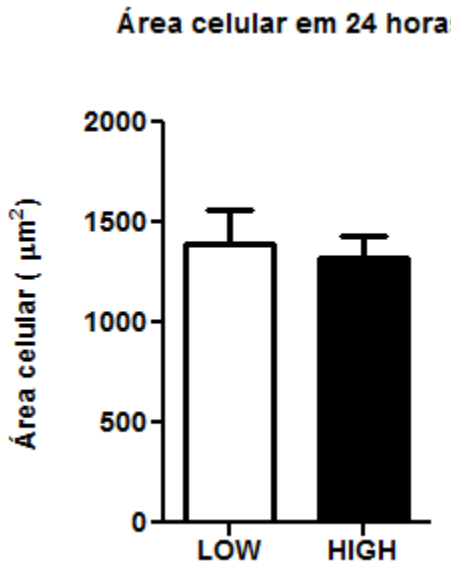


Figura 33- Quantificação da área de fibroblastos após 24 horas sobre fibronectina (1 µg/ml). Dez (10) campos por grupo foram fotografados (utilizando objetiva de 10 X). A medida foi realizada com programa Image J (NIH).

5.3.3 Fibroblastos em meio HIGH não alteram a polaridade celular comparados com fibroblastos em meio LOW

As mesmas células submetidas ao ensaio de visualização de actina foram analisadas para a polaridade celular, através do cálculo da razão entre as medidas dos eixos maiores e menores da célula (Figura 34). Os valores encontrados mostram que os fibroblastos expostos em meio LOW ou HIGH apresentam perfis de polaridade celular semelhantes, metade (cerca de 50% de células LOW e 47,61% de células HIGH) sendo, portanto, consideradas células polarizadas e muito polarizadas (Tabela 1 e Figura 35).

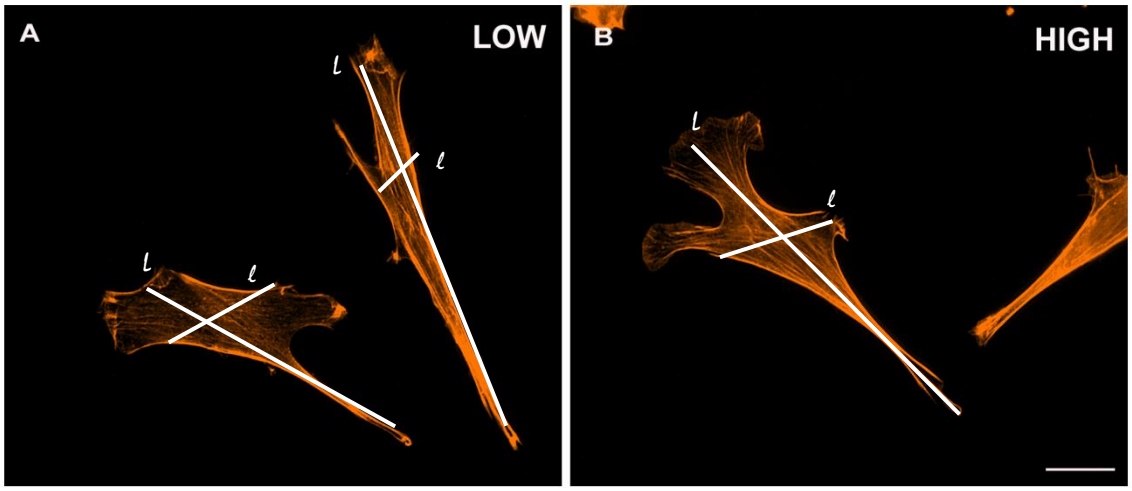


Figura 34- Figuras ilustrativas dos eixos maior (L) e menor (l) de células LOW e HIGH, utilizados para o cálculo da polaridade celular (eixo maior/eixo menor). Os eixos das células foram medidos utilizando o software Image J (NIH). Dez (10) campos foram capturados com objetiva 63 X. N=65 células por grupo. A= fibroblastos em meio LOW, B= fibroblastos em meio HIGH. Células coradas com faloidina-Rodamina. Barra= 10µm.

Tabela 1- Índice de polaridade dos fibroblastos em meio LOW e HIGH

	1	2 e 3	4, 5 e >5
LG	3 (4,83%)	31 (50%)	28 (45,15%)
HG	3 (4,76 %)	30 (47,61%)	30 (47,6%)

Distribuição de células de acordo com seu índice de polaridade, calculado como a razão entre o eixo maior/eixo menor. Valores 1 = não polarizadas, 2 e 3= polarizadas, valores 4, 5 e >5 = muito polarizadas. LG=Low, HG=High. Número de células LOW-62, HIGH=63.

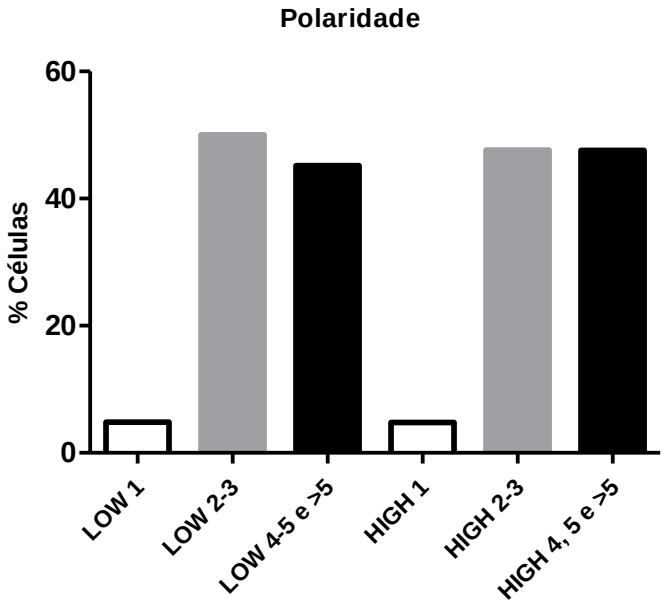


Figura 35- Distribuição de células de acordo com seu índice de polaridade, calculado como a razão entre o eixo maior/eixo menor. Valores 0 = não polarizadas, 1-3= polarizadas, valores 4-5 e >5 = alta polaridade. LG=Low, HG=High. Número de células LOW-62, HIGH=63.

5.3.4 A concentração elevada de glicose altera a morfologia de células NIH-3T3 cultivadas em gel tridimensional (3D) de colágeno e fibronectina

O ambiente tridimensional mimetiza melhor o ambiente in vivo de fibroblastos que o ambiente bidimensional (placas de Petri). Para analisarmos a morfologia e citoesqueleto de actina de fibroblastos nesta condição, confeccionamos géis constituídos por colágeno I e fibronectina com as células imersas na matriz. A fixação foi realizada após 24 horas de cultura, seguida da coloração com faloidina-Alexa 488 para visualização do citoesqueleto de F-actina. Fibroblastos em meio LOW apresentaram forma alongada, fusiforme e polaridade definida. Fibroblastos em meio HIGH apresentaram um corpo celular mais arredondado, finos prolongamentos e várias projeções, especialmente nas extremidades. A polaridade nem sempre pareceu bem definida, devido ao fato das células apresentarem mais de uma projeção (Figura 36).

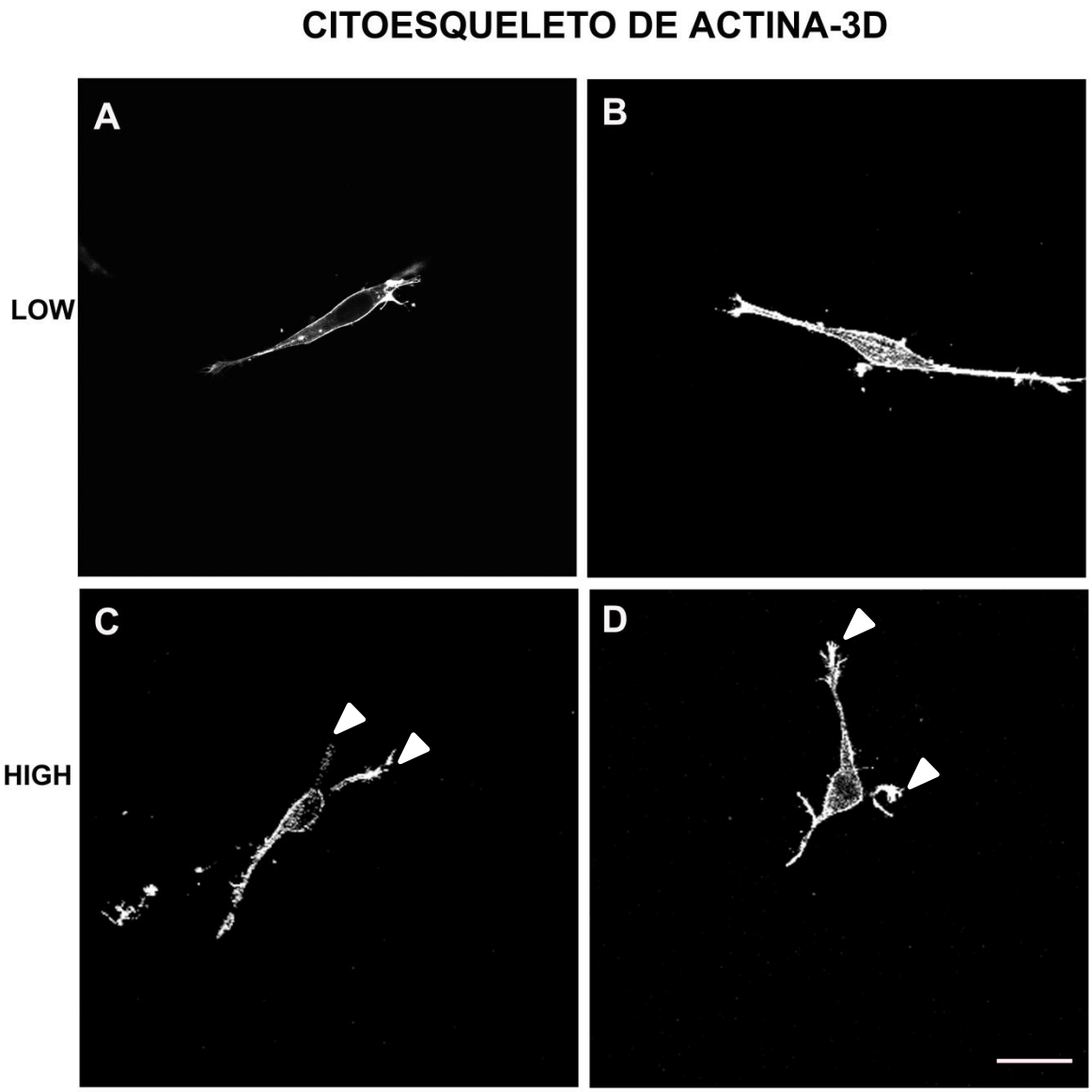


Figura 36- Citoesqueleto de actina de fibroblastos NIH-3T3 cultivados em gel tridimensional (3D) de colágeno I (0,850 mg/ml) e fibronectina (10 µg/ml). Células cultivadas com glicose 5 mM (LOW) apresentam morfologia fusiforme, com projeções simétricas e polaridade definida em relação à migração (A e B). Células cultivadas com glicose 30 mM (HIGH) apresentam morfologia mais arredondada com projeções assimétricas em diferentes regiões (C e D, cabeças de setas). Objetiva 63 X. Barra= 20µm.

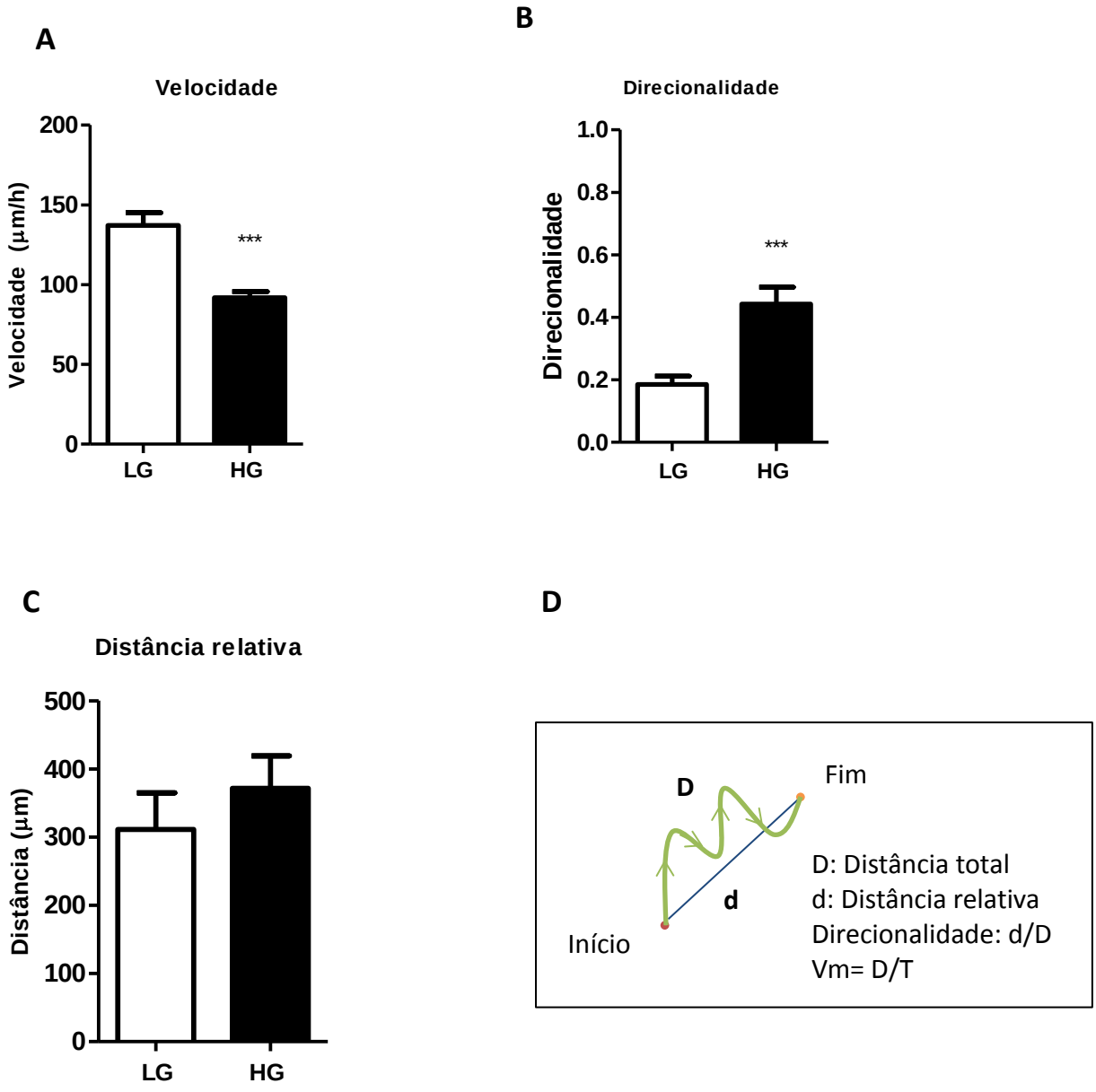
5.3.5 A concentração elevada de glicose altera diversos parâmetros da migração de fibroblastos NIH-3T3 sobre fibronectina

Os fibroblastos expostos à alta concentração de glicose (HIGH) por 15 dias foram submetidos ao ensaio de migração celular sobre fibronectina por time-lapse durante 18 horas. Conforme esperado, a glicose elevada reduziu a velocidade de migração quando comparada com glicose em concentração fisiológica (137,10 ± 8,08 *vs.* 91,89 ± 3,83 µm/h, média ± EPM, ***=p<0,0005) (Figura 37 A). Outro parâmetro importante na migração celular é a direcionalidade, que é a razão entre a distância relativa sobre a distância total. Valores próximos de zero (0) correspondem a células pouco direcionais e valores próximos de 1 correspondem a células completamente direcionais. É interessante observar que células NIH-3T3 são naturalmente pouco direcionais, com valores próximos de 0,2 (Figura 37 B). A concentração de glicose no meio aumentou a direcionalidade celular, o que poderia estar relacionado à dificuldade na retração da porção traseira das células, ocasionando as caudas alongadas (0,18 ± 0,02 vs. 0,44 ± 0,05, média ± EPM, ***=p<0,001) (Figura 37 B).

Com relação à distância relativa, os resultados mostram que não há diferença entre os fibroblastos expostos à alta concentração de glicose, quando comparados com os fibroblastos em meio com baixa concentração de glicose (Figura 37 C). A figura 37 D explica em esquema de direcionalidade, distância relativa e distância total. Estes resultados sugerem que a menor velocidade de células em meio HIGH foi compensada pela maior direcionalidade, tornando a migração lenta, mas efetiva.

Foi também realizada uma análise qualitativa da migração nestas duas condições. Como observado na Figura 37 E, os fibroblastos em meio LOW apresentaram alterações morfológicas ao longo do experimento e foram muito dinâmicos, com deslocamento do corpo celular. Os fibroblastos em meio HIGH deslocaram-se menos ao longo do período analisado, formando caudas alongadas devido à dificuldade de retração das mesmas

(setas vermelhas), por vezes deixando fragmentos celulares durante o trajeto. Outras células apresentaram baixa polaridade, e ao longo de 18 horas não mostraram uma definição de direção (seta azul).



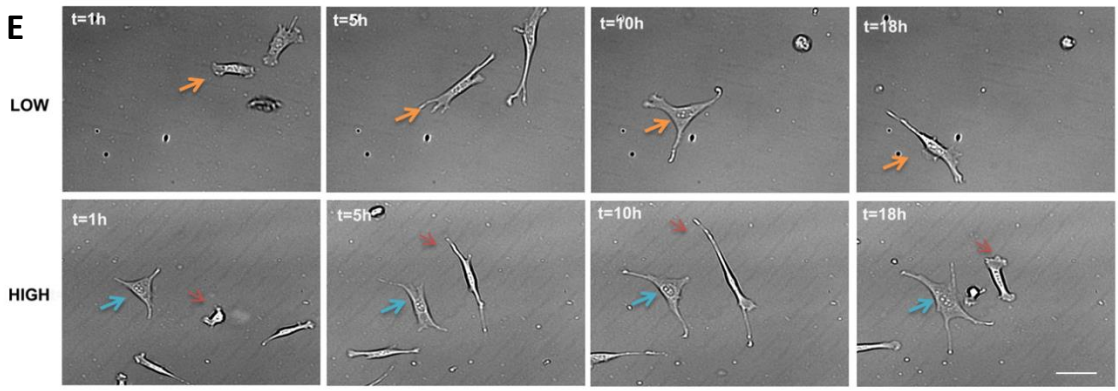
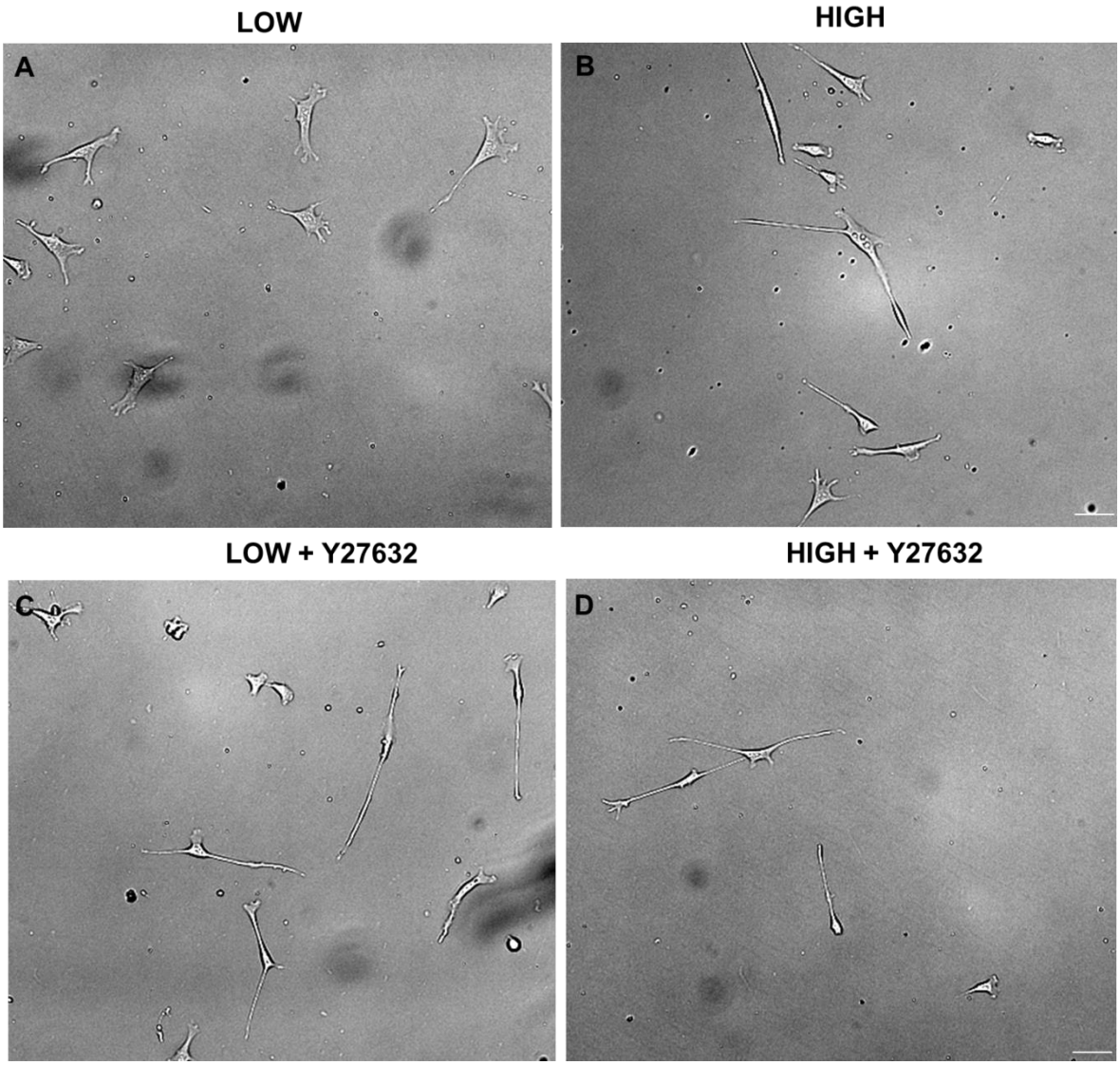


Figura 37- Imagens representativas da migração de fibroblastos NIH-3T3 cultivados em meio LOW (LG) e HIGH (HG). (A) Velocidade de migração expressa em µm/h (B) Direcionalidade celular, calculada pela razão entre a distância relativa/distância total. (C) Distância relativa expressa em µm. D) Esquema ilustrando os parâmetros analisados. (E) Imagens obtidas de filmes de time-lapse ao longo de 18 horas de migração. As imagens foram capturadas em 0, 5, 10 e 18 horas com objetiva de 20x. Seta laranja: célula controle; seta azul: célula sem direção definida; seta vermelha: célula com cauda alongada. Barra=10µm. Número de células por experimento LOW = 33 e HIGH = 39. Análise estatística utilizada: teste t de student, $p< 0,05$.

5.3.6 A utilização do inibidor de ROCK (Y27632) altera a morfologia em células LOW, mas não de células HIGH e não altera a velocidade de migração

A utilização do inibidor de ROCK (Y27632 - 30 µm) altera a morfologia celular em fibroblasto NIH 3T3 LOW. Observamos a presença de células alongadas e com cauda longa (Figura 38 C), quando comparamos com as células LOW apenas em meio controle (Figura 38 A). Em células HIGH + Y27632, não observamos diferença na morfologia comparando com células HIGH, as células continuavam apresentando cauda longa e múltiplas protrusões (Figura 38 B e D). Não houve alteração na velocidade de migração comparando as células LOW + Y27632 e HIGH + Y27632 (135,50 ± 12,33 *vs.*118,01 ± 10,01, média ± EPM) (Figura 38 E).


LOW
HIGH
A
B
LOW + Y27632
HIGH + Y27632
C
D

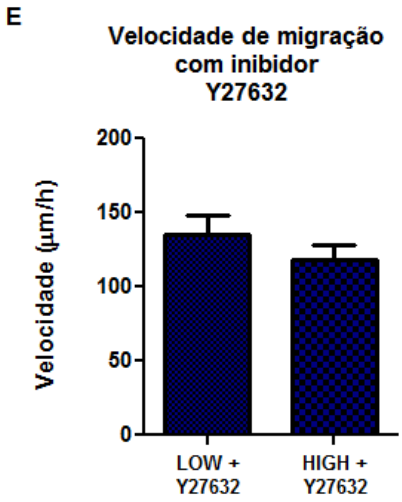
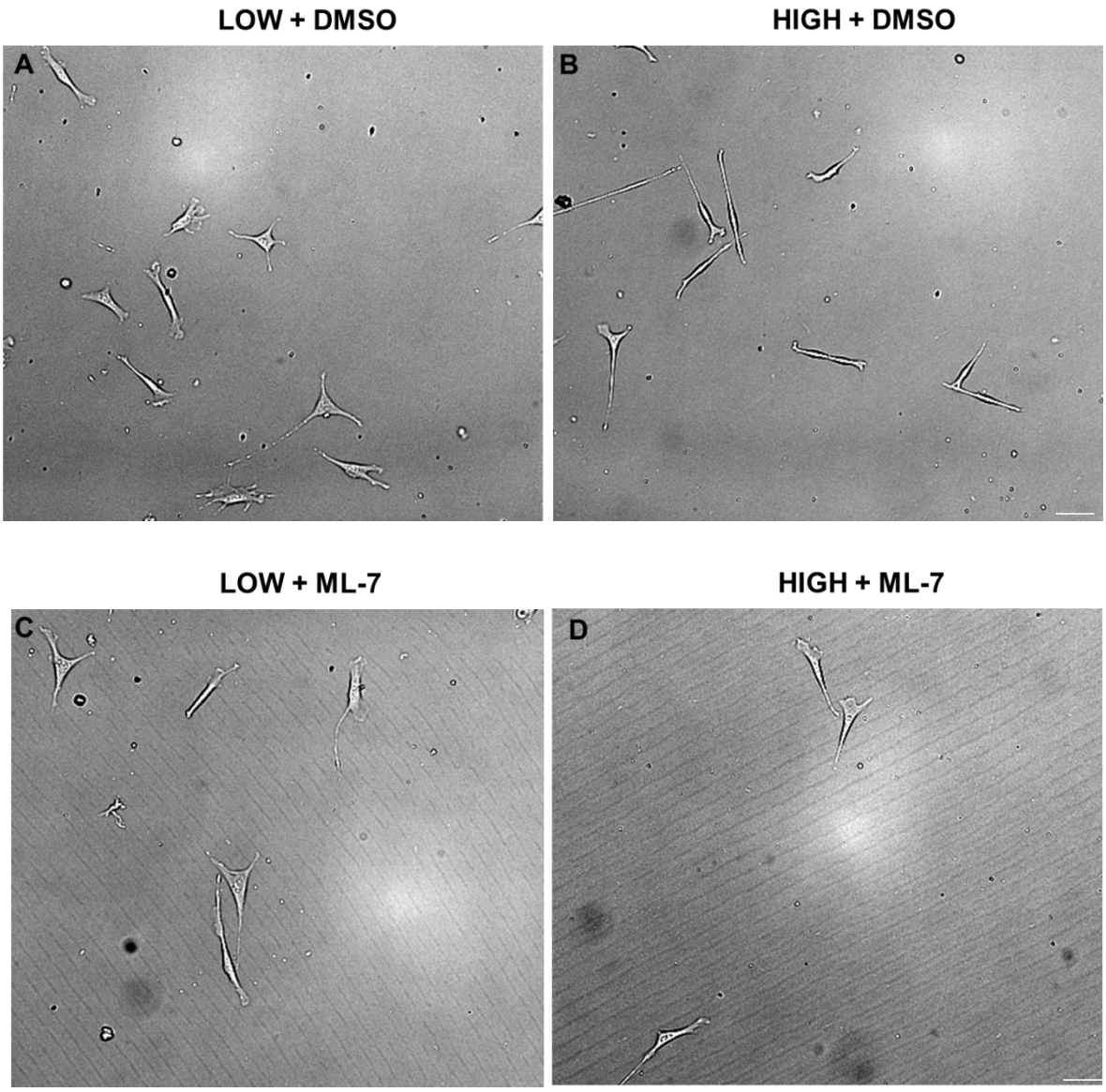


Figura 38- Imagens representativas da migração de fibroblastos NIH-3T3 cultivados em meio LOW (LG) e HIGH (HG) com ou sem inibidor de ROCK (Y27632-30 µm). (A) Imagens de células LOW obtidas de filmes de time-lapse ao longo de 18 horas de migração. (B) Imagens de células HIGH obtidas de filmes de time-lapse ao longo de 18 horas de migração. (C) Imagens de células LOW + Y27632 obtidas de filmes de time-lapse ao longo de 18 horas de migração. (D) Imagens de células HIGH + Y27632 obtidas de filmes de time-lapse ao longo de 18 horas de migração. (E) Velocidade de migração expressa em µm/h Barra= 50 µm. Número de células por experimento LOW = 16; HIGH = 14; LOW + Y27632= 18; HIGH + Y27632= 19. Análise estatística utilizada: teste t de student, ***p< 0,05.

5.3.7 A utilização do inibidor de MLCK (ML-7) não alterou a morfologia em células LOW, mas alterou em HIGH e aumentou a velocidade de migração

A utilização do inibidor de MLCK (ML-7 20 µm) não alterou a morfologia das células LOW (comparando Figura 39 A com Figura 39 C), mas modificou a morfologia das células HIGH, que passaram a apresentar ausência da cauda longa, e uma morfologia bem semelhante às células LOW (comparando figura 39 A com Figura 39 D). A velocidade de migração das células LOW diminuiu com a adição de ML-7, comparando LOW + ML-7 com LOW + DMSO (109,00 ± 6,45, *vs.* 137,00 ± 7,20, média ± EPM, * p< 0,0001) (Figura 39 E). A velocidade de migração das células HIGH aumentou com a adição de ML-7, seja em relação à HIGH + DMSO (100,50 ± 9,06 *vs.* 150,10 ± 9,35, média ± EPM, * p< 0,0001) ou em relação à LOW + ML-7 (109,0 ± 6,45 *vs.*150,10 ± 9,35, média ± EPM, ** p< 0,005) (Figura 39 E). O DMSO foi utilizado como diluente da droga ML-7, por isso o utilizamos como

controle. Houve redução de velocidade de migração em células HIGH + DMSO comprado com células LOW + DMSO (137,00 ± 7,20 vs. 100,50 ± 9,06, média ± EPM, **p<0,05) (Figura 39 E).



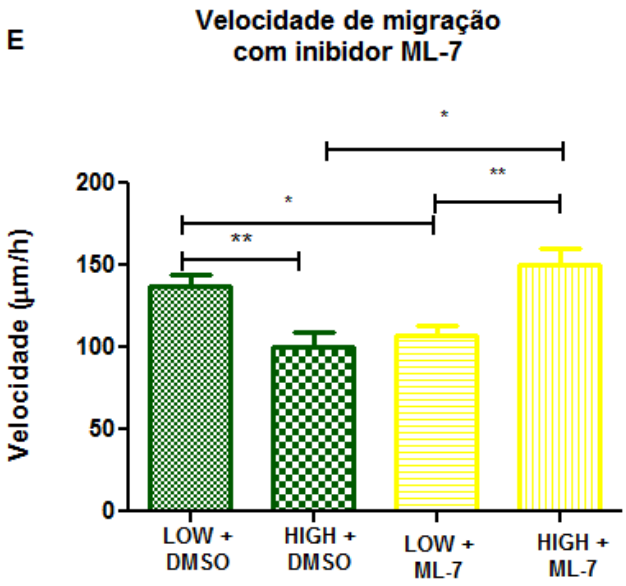


Figura 39- Imagens representativas da migração de fibroblastos NIH-3T3 cultivados em meio LOW (LG) e HIGH (HG) com ou sem inibidor de MLCK (ML-7 20 µm). (A) Imagens de células LOW + DMSO obtidas de filmes de time-lapse ao longo de 18 horas de migração. (B) Imagens de células HIGH + DMSO obtidas de filmes de time-lapse ao longo de 18 horas de migração. (C) Imagens de células LOW + ML-7 obtidas de filmes de time-lapse ao longo de 18 horas de migração. (D) Imagens de células HIGH + ML-7 obtidas de filmes de time-lapse ao longo de 18 horas de migração. (E) Velocidade de migração expressa em µm/h Barra= 50 µm. Número de células por experimento LOW + DMSO = 10; HIGH = 11; LOW + ML-7= 15; HIGH + ML-7= 15. Análise estatística utilizada: teste t d student, p< 0,05.

5.3.8 A utilização dos inibidores de MLCK (ML-7) e ROCK (Y27632) juntos altera a morfologia de células LOW, mas não de células HIGH e diminui a velocidade de migração

O uso dos inibidores de ROCK (Y27632) e MLCK (ML-7) juntos alterou a morfologia de células LOW + ML-7 + Y27632 (quando comparadas com células LOW da figura 38 A e LOW + DMSO da figura 39 A), deixando-as bem alongadas e com a presença de caudas longas (Figura 40 A). As células HIGH + ML-7 + Y27632 continuaram apresentando morfologia bem alongada, fusiforme e com caudas longas (Figura 40 B). A velocidade de migração reduziu nas células HIGH + ML-7 + Y27632 (119,21 ± 6,25 *vs.* 93,04 ± 6,13, média ± EPM, * p< 0,05) (Figura 40 C).

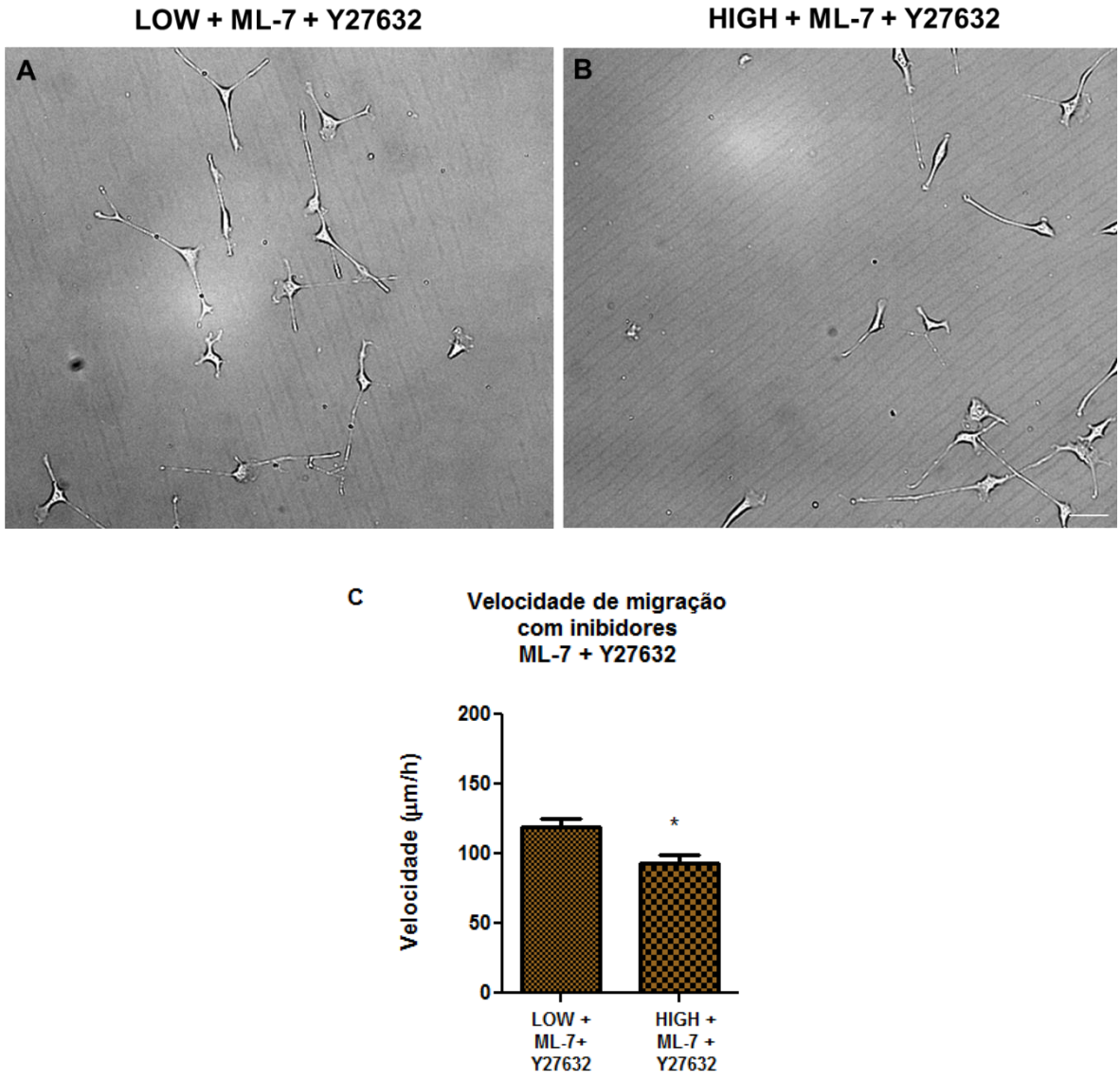


Figura 40- Imagens representativas da migração de fibroblastos NIH-3T3 cultivados em meio LOW (LG) e HIGH (HG) com ou sem inibidor de MLCK (ML-7 20 µm) e ROCK (Y27632 30 µm). (A) Imagens de células LOW + ML-7 + Y27632 obtidas de filmes de time-lapse ao longo de 18 horas de migração. (B) Imagens de células HIGH + ML-7+ Y27632 obtidas de filmes de time-lapse ao longo de 18 horas de migração. (C) Velocidade de migração expressa em µm/h Barra= 50 µm. Número de células por experimento LOW + ML-7 + Y27632= 20; HIGH + ML-7+ Y27632= 23. Análise estatística utilizada: teste t de student, $p< 0,05$.

5.3.9 A concentração elevada de glicose não altera a expressão e distribuição de miosina II A em fibroblastos NIH-3T3

Após a constatação de que os fibroblastos em meio HIGH apresentavam uma diminuição da velocidade de migração, associada com uma alteração no citoesqueleto de actina, a presença de cauda longa (dificuldade de retração da porção traseira) e uma aparente diminuição de fibras de estresse, resolvemos investigar a potencial regulação da expressão e distribuição da miosina II A nos fibroblastos.

Os ensaios de imunocitoquímica para miosina IIA mostraram que esta proteína é bastante expressa e encontra-se distribuída por todo o corpo celular e processos; está também presente em fibras de estresse (Figura 41). A glicose elevada não alterou esta distribuição (Figura 41). A análise por western blotting confirmou a não alteração da expressão de miosina II A pela glicose (Figura 42).

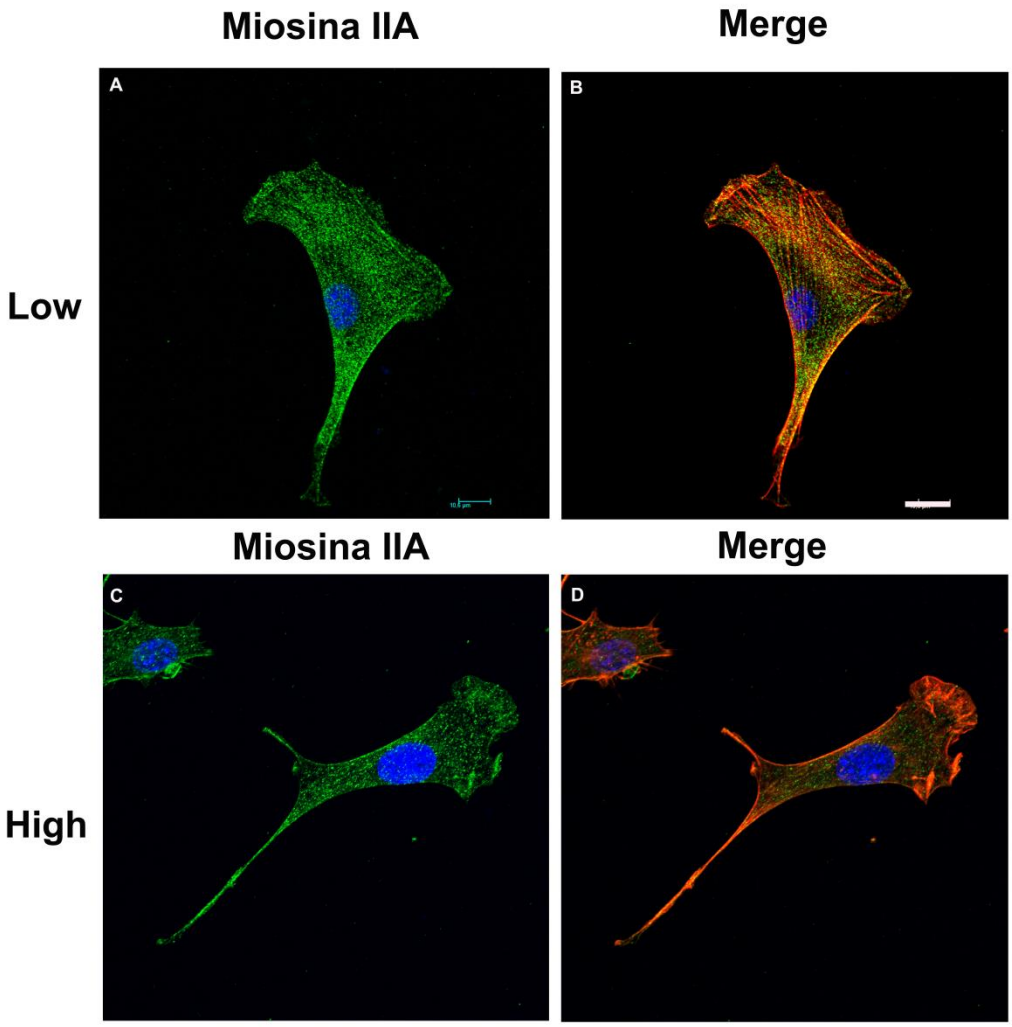


Figura 41- Imunofluorescência para miosina IIA. Fibroblastos NIH-3T3 cultivados em meio LOW (A e B) ou HIGH (C e D). Miosina II A (A e C), Miosina IIA + F-actina (vermelho) (B e D). Verde: anticorpo primário anti-MIIA. Vermelho=F- actina. Azul= núcleo. Objetiva 63 X. Barra= 10 µm

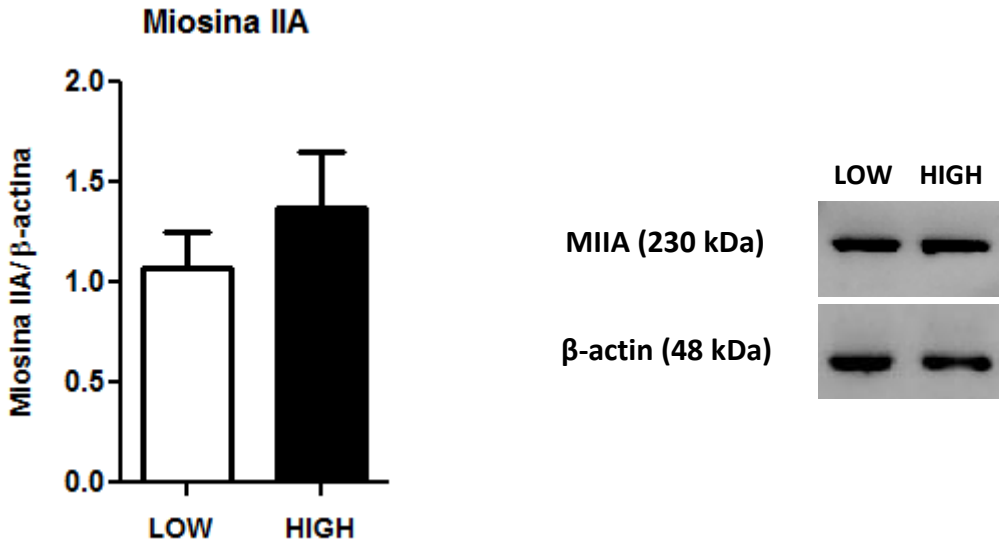


Figura 42- Western Blotting para miosina IIA. Lisado total de fibroblastos cultivados em meio LOW e HIGH foi submetido à eletroforese e subsequente imunodetecção de miosina IIA e β-actina (controle interno). Foram realizados cinco experimentos com três extrações diferentes. Teste t de Student. A densitometria óptica das bandas foi realizada com software Image J e os valores obtidos através da razão entre miosina IIA e β-actina.

5.3.10 A concentração elevada de glicose altera a distribuição, mas não a expressão de miosina II B em fibroblastos NIH-3T3

Em fibroblastos cultivados em meio LOW a miosina IIB estava distribuída na região da cauda e centro da célula, mas não na região do lamelipódio (Figura 43 A e B). Já em fibroblastos cultivados em meio HIGH, a miosina IIB apresentou-se distribuída em todo o corpo célula, de forma uniforme. Além de estar presente na região da cauda e lamela, também foi observada na região do lamelipódio, diferentemente das células controle (Figura 43 C e D). A análise do lisado total dos fibroblastos cultivados em meio LOW e HIGH por western blotting mostrou que não há alteração na expressão desta proteína entre os grupos (Figura 44).

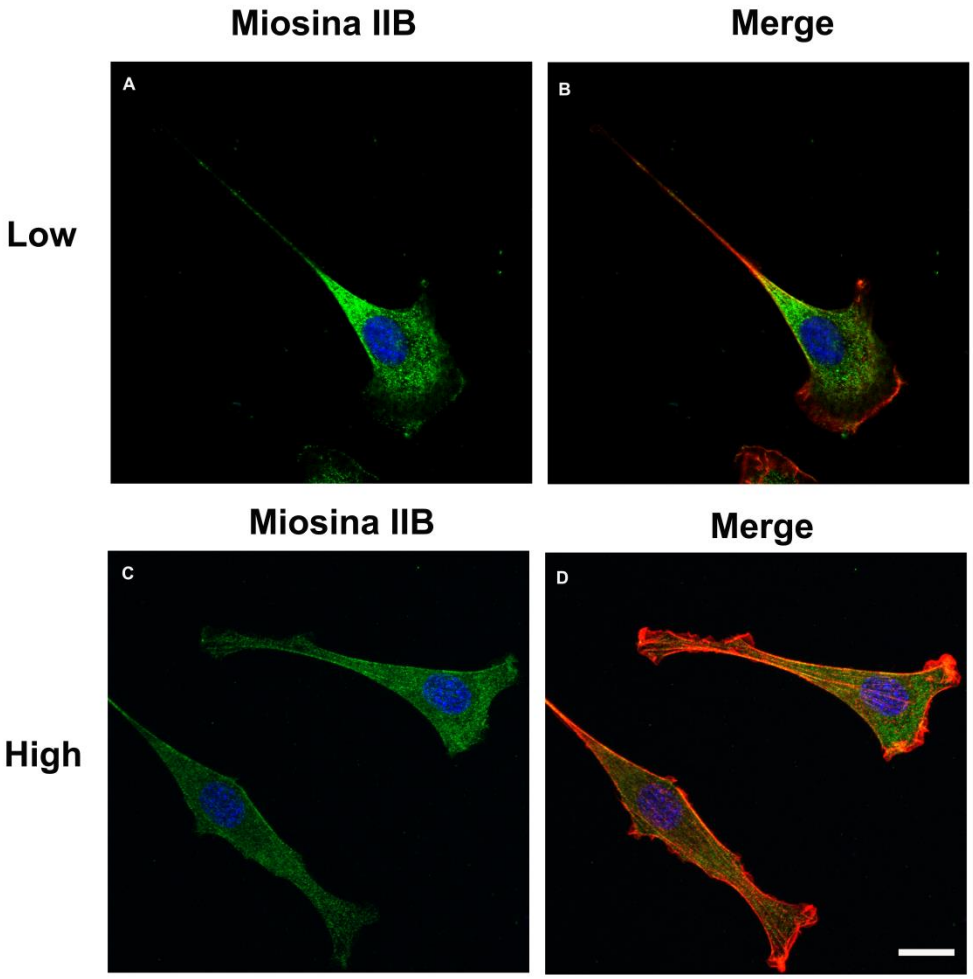


Figura 43- Imunofluorescência para miosina IIB. Células low (A e B) high (C e D) apresentam diferenças na distribuição e imunomarcação da proteína miosina II B (A e C). Em B e D observa-se a sobreposição entre actina e miosina IIB. Verde: anticorpo primário anti-MIIB. Vermelho=F- actina. Azul= núcleo. Objetiva 63 X. Barra= 10 µm.

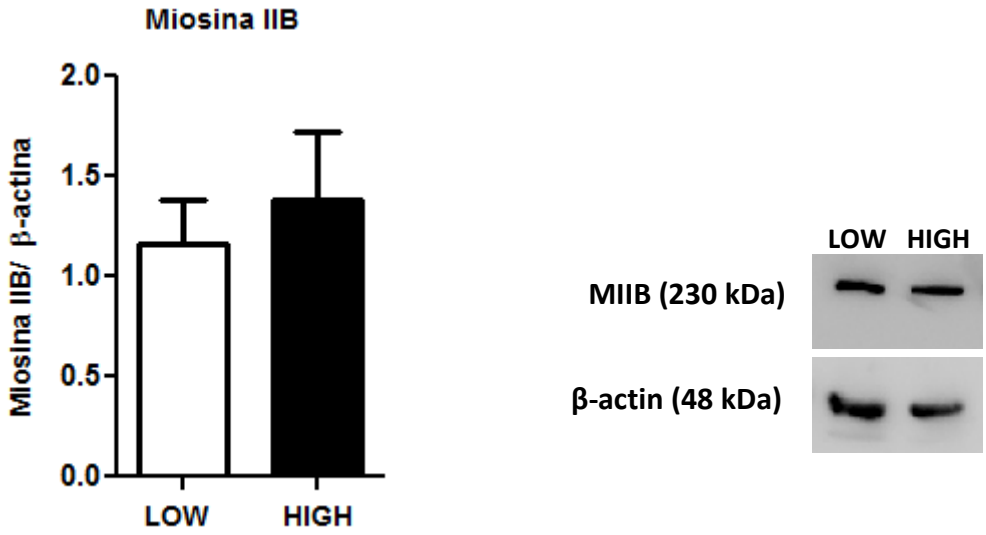


Figura 44- Western Blotting para miosina IIB. Lisado total de fibroblastos cultivados em meio LOW e HIGH foi submetido à eletroforese e subsequente imunodetecção de miosina IIB e β-actina (controle interno). Foram realizados cinco experimentos com três extrações diferentes. Teste t de Student. A densitometria óptica das bandas foi realizada com software Image J e os valores obtidos através da razão entre miosina IIB e β-actina.

5.3.11 A concentração elevada de glicose não altera a distribuição da porção regulatória da cadeia leve de miosina II (MRLC) em fibroblastos NIH-3T3

A proteína MRLC é a cadeia leve regulatória de miosina II, sendo responsável pela regulação da ativação dos sítios de miosina. As análises de imunocitoquímica mostraram que não houve diferença entre os grupos LOW e HIGH. A MRLC apresentou-se distribuída uniformemente em todo o corpo celular, com marcação puntiforme (Figura 45).

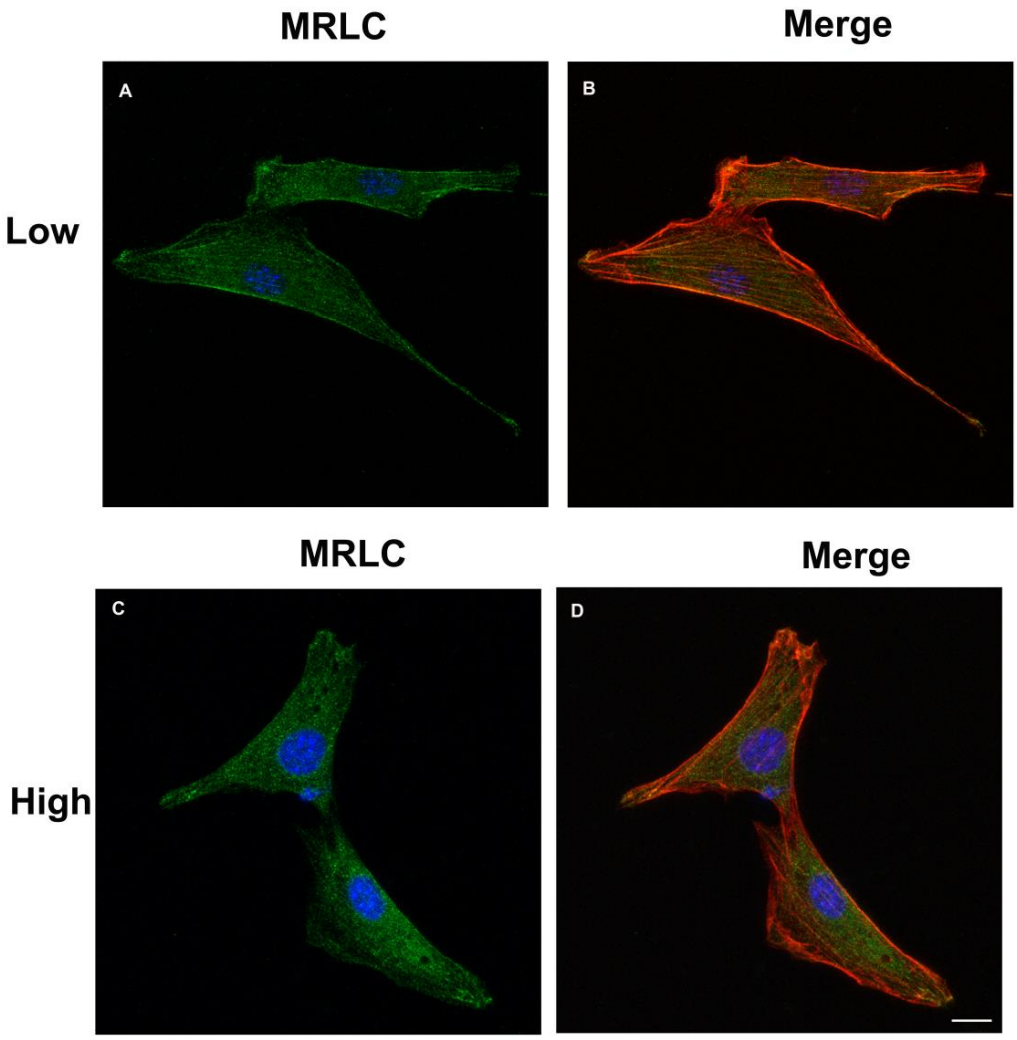


Figura 45- Imunofluorescência para MRLC. Células low (A e B) high (C e D) não apresentam diferenças na distribuição e imunomarcação da proteína MRLC (A e C). Em B e D observa-se a sobreposição entre actina e MRLC. Verde: anticorpo primário anti-MRLC. Vermelho=F- actina. Azul= núcleo. Objetiva 63 X. Barra= 10 µm.

5.3.12 Fibroblastos cultivados em meio HIGH possuem menos MLC fosforilada (menor atividade de miosina II) comparados com fibroblastos cultivados em meio LOW

A ativação de miosina II ocorre através da fosforilação de MLC, por cinases diversas, como ROCK ou MLCK. O anticorpo utilizado por nós reconhece um sítio de fosforilação comum a estas duas cinases. O ensaio de western blotting revelou que os

fibroblastos cultivados em meio HIGH possuem menor quantidade de MLC fosforilada (pMLC) quando comparados a fibroblastos cultivados em meio LOW (Figura 46).

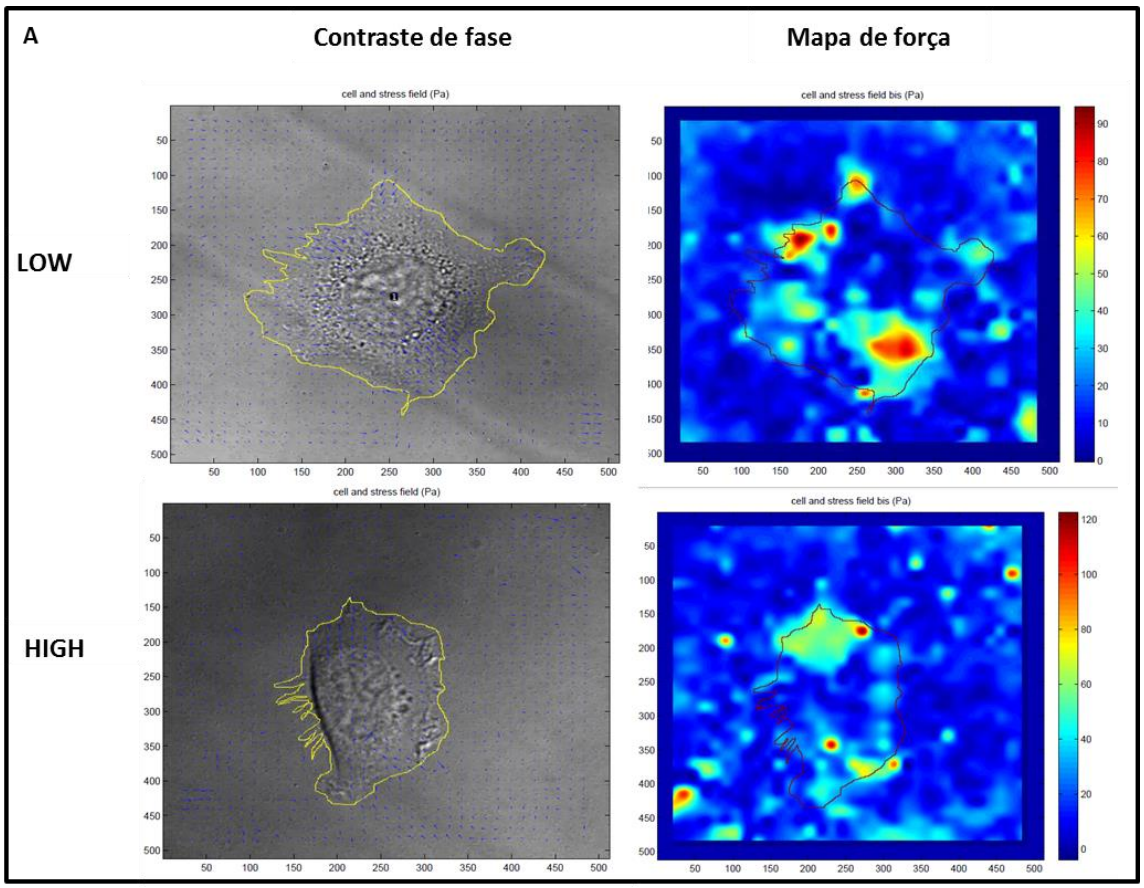
Figura 46- Western Blotting para MLC fosforilada (pMLC). Lisado total de fibroblastos cultivados em meio LOW e HIGH foi submetido à eletroforese e subsequente imunodetecção de MLC fosforilada e β-actina. Foram realizados três experimentos com três extrações diferentes. Teste t de Student, *P<0,05. A densitometria óptica das bandas foi avaliada com software Image J e os valores obtidos através da razão entre MLC fosforilada e β-actina.

.

5.3.13 Fibroblastos cultivados em meio HIGH exercem menor força de tração sobre o substrato, detectada pela técnica de Traction force Microscopy (TFM), quando comparados a fibroblastos cultivados em meio LOW

Durante a migração de fibroblastos, ocorre interação com o substrato através da ação de complexos adesivos contendo integrinas e miosina II (dentre outras inúmeras proteínas). Por meio dos complexos em amadurecimento e maduros as células exercem força sobre o substrato, devido à atividade de miosina II. A técnica de TFM detecta a força que as células exercem sobre o substrato através de microesferas fluorescentes, cujo sinal é registrado pelo microscópio confocal. Estas microesferas se deslocam quando as células são separadas do substrato por tripsinização, e a força é proporcional a este

deslocamento. O deslocamento é medido em vetores, e valores de deslocamento são transformados em intensidade e cor, e assim o gráfico de mapa de força é gerado (Figura 47 A). Os resultados mostram que os fibroblastos em meio HIGH exercem menor força de tração sobre o substrato (força total). A razão entre força total e a área da célula (mean stress) também estava reduzida em células cultivadas em meio HIGH (Figura 47 B e C).



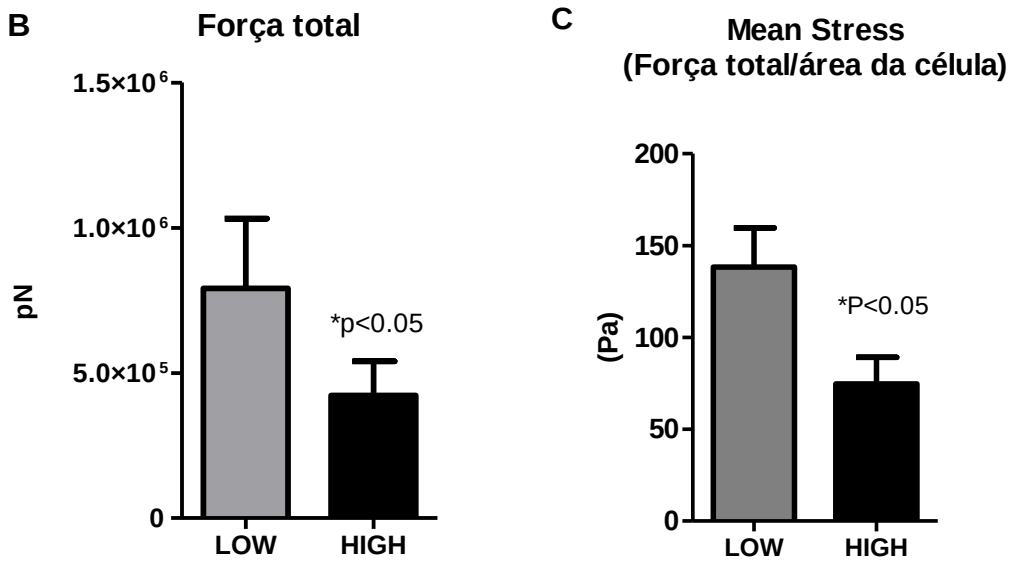


Figura 47- Ensaio de detecção de força sobre o substrato por *Traction Force Microscopy* (TFM). A) imagens em contraste de fase e o mapa de força gerado após a adição da tripsina (células estão desaderindo). Células em meio HIGH apresentam menor força de adesão ao substrato, observada no mapa de força pela menor presença de pontos vermelhos e quantificados no gráfico. B) A força total exercida no substrato é menor em fibroblastos em meio HIGH em com os fibroblastos em meio LOW. C) Mean stress é a relação entre a força total e área da célula e também mostra uma redução em fibroblastos em meio HIGH. Teste t de student, com *=P<0.05. Foram realizados três experimentos com duas exposições diferentes. n=6 células LOW e n= 7 células HIGH.

Os resultados apresentados nesta tese encontram-se resumidos no item anexo, nas páginas 133-137.

6 DISCUSSÃO

Este estudo fornece resultados novos e complementares sobre dois importantes aspectos que envolvem a cicatrização deficiente, uma complicação frequente do Diabetes Mellitus: o efeito da glicação do colágeno sobre fibroblastos e o papel da alta concentração de glicose na contratilidade destas células. Assim como descrito nos resultados, a discussão será dividida, mas com um contexto em comum, uma vez que os dois grupos de resultados são paralelos e complementares para embasar outros estudos e aumentar o grau de compreensão do processo de cicatrização deficiente de feridas em pacientes diabéticos.

Com o envelhecimento e o aumento do número de indivíduos diabéticos, torna-se cada vez mais necessário o entendimento de mecanismos relacionados às complicações desta patologia. Sabe-se que envelhecimento e diabetes possuem em comum o aumento de AGEs, que ainda são pouco compreendidos em relação às funções que desempenham nestas duas condições. Existem diversos AGEs utilizados em estudos com o objetivo de mimetizar o que acontece *in vivo* no microambiente de tecidos ou órgãos de pacientes diabéticos

No caso específico do nosso estudo, a pele foi escolhida como órgão a ser estudado e o método selecionado para glicação *in vitro* do colágeno foi o que utiliza ácido glioxilíco. Na pele, sabe-se que o colágeno tipo I possui uma meia-vida longa, podendo assim acumular muitas alterações causadas pela alta concentração de glicose circulante.

Utilizamos ratos da linhagem Wistar com DM induzido pela droga estreptozotocina, que destrói células produtoras de insulina no pâncreas; os animais permaneceram diabéticos por 30 dias. Após esse período, os fibroblastos dérmicos foram isolados e mantidos em meio de cultura *in vitro* com a concentração de glicose elevada. Assim, de maneira pontual, mantivemos algumas das condições existentes *in vivo* e avaliamos os efeitos da glicação sobre estes fibroblastos. Observamos que, pelo menos

para o colágeno extraído da cauda do rato, 30 dias de DM não foram suficientes para aumentar significativamente o grau de glicação (resultados não apresentados); por esta razão optamos pela glicação in vitro.

Inicialmente padronizamos a glicação do colágeno tipo I derivado de cauda de rato e analisamos os efeitos desta glicação sobre suas propriedades bioquímicas e mecânicas. Foi utilizada a metodologia de Liao, Zakhaleva e Chen (2009), que utilizaram colágeno comercial liofilizado, ácido glioxilíco e cianoborohidreto de sódio, numa reação rápida (24 horas). A confirmação da glicação naquele estudo foi feita por imunohistoquímica para CML (aumentada) e ensaios de propriedades mecânicas, como curva de tensão/deformação (reduzida), dureza (elevada) e elasticidade (reduzida). No presente estudo utilizamos colágeno liofilizado originado da cauda de ratos não-diabéticos por extração em ácido. Realizamos a glicação com ácido glioxilíco e cianobodohidreto de sódio e analisamos a formação de AGEs totais por fluorimetria, segundo trabalho de Pageon et al., 2007. Foram utilizadas como amostras de referência para detecção de AGEs totais (padrões positivo e negativo) a albumina sérica obtida de pacientes diabéticos descompensados e de pacientes controles. Os resultados obtidos mostraram que a glicação in vitro foi efetiva e que estava dentro de padrões que poderiam ser facilmente observados em pacientes diabéticos. A presença de aminas livres nas amostras de colágeno glicado também mostrou-se menor, comparando-se com o colágeno normal, conforme esperado. Demonstramos também que o colágeno glicado poderia ser reconstituído para formar um gel tridimensional, mas apresentava, conforme análise por *Second Harmonic Generation* (SHG), feixes de fibras mais espessos e alguns grumos, diferentemente do colágeno não glicado. Essas metodologias foram previamente utilizadas por Francis-Sedlak et al. (2009) e têm sido bastante empregadas para confirmação de glicação in vitro. Por fim, ensaios para avaliação de propriedades mecânicas dos colágenos liofilizados foram realizadas pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas-IPT, segundo metodologia descrita por Liao, Zakhaleva e Chen (2009), e mostraram uma diminuição da resistência à tração e do módulo de elasticidade, revelando que o colágeno glicado possuía maior facilidade de romper-se quando submetido a forças

externas. Sabe-se que o colágeno glicado apresenta, de fato, propriedades mecânicas alteradas, já que indivíduos diabéticos apresentam diminuição da viscoelasticidade de tendões, perda da plasticidade e tenacidade de ossos, aumento da rigidez de cartilagens, perda da elasticidade da pele e aumento da resistência à ação das MMPs (GAUTIERI et al., 2014).

O colágeno glicado in vitro foi também empregado em um estudo recente em colaboração Pennacchi et al. (2015) utilizando modelo de pele equivalente reconstituída. Naquele modelo, a confirmação da glicação foi feita por imunocitoquímica para CML, observando-se um aumento evidente tanto na derme quanto na epiderme. A análise por SHG revelou diferenças na organização do colágeno glicado na pele equivalente; a derme apresentou-se mais compacta e achatada, com a presença de espaços vazios, talvez resultantes das ligações cruzadas aumentadas no colágeno glicado. Descreveram-se, pela primeira vez, diversas alterações na epiderme quando a derme é glicada in vitro, como p. ex. diminuição da espessura, aumento de expressão de citoqueratina 10, aumento de E-caderina e desmogleína; na derme observou-se, além da alteração na distribuição de colágeno tipo I, a ausência de alteração na expressão de alfa α-actina de músculo liso (miofibroblastos).

Em seguida à padronização da glicação in vitro, foram realizados os ensaios funcionais com o objetivo de investigar o efeito da glicação na interação célula-matriz de colágeno. Para isso, realizamos os ensaios com os fibroblastos derivados de ratos controle e diabéticos. Em um estudo anterior do nosso grupo observamos que fibroblastos derivados de ratos diabéticos apresentam menor expressão de integrinas ligantes de fibronectina na superfície celular (em fase de preparação) [3]. Sendo assim, hipoteticamente, a resposta de fibroblastos de ratos diabéticos à matriz glicada poderia ser diferente daquela apresentada por fibroblastos derivados de ratos controle. A curva de crescimento, resultante de proliferação e morte celular ao longo de 72 horas, mostrou que a glicação do colágeno reduziu o crescimento de fibroblastos derivados de diabéticos

[3] Almeida MES, Monteiro KS, Kato EE, Sampaio SC, Braga TT, Camara NOS, Lamers ML, Santos MF. Diabetes Mellitus Reduces the Cell Surface Expression of Fibronectin Receptors in Rat Dermal Fibroblasts and Impairs Cell Adhesion and Migration. 2015

após 72 horas; este resultado não foi observado sobre o colágeno não glicado. Provavelmente esta redução estava relacionada à proliferação celular, já que o número de células mortas coradas com azul de Tripan não aumentou neste período. Este resultado corrobora estudos mostrando diminuição da proliferação celular frente à glicação com 3-Deoxyglucosona (3-DG) em gel 3D, via diminuição de ERK1/2 (LOUGHLIN; ARTLETT, 2009) e também em gel 3D glicado com ácido glioxílico (LIAO; ZAKHALEVA; CHEN, 2009).

Durante a adesão inicial das células ao colágeno (1 hora), fibroblastos derivados de ratos controle e diabéticos similarmente apresentaram menor área de espraiamento frente à glicação. Da mesma forma, durante a migração, a formação de protrusões por estas células também foi retardada. No entanto, sobre o colágeno normal, enquanto fibroblastos derivados de ratos controle apresentaram majoritariamente um lamelipódio único e progressivo ao longo do tempo, fibroblastos derivados de diabéticos apresentaram projeções múltiplas. Segundo Hudson et al. (2008), o receptor de AGEs (RAGE), quando ativado, pode ativar a GTPase Rac1 (dentre outras vias) que, por meio de seus efetores, poderia promover a formação de múltiplos lamelipódios simultaneamente. Sendo assim, assumindo que células derivadas de diabéticos apresentam maior atividade de RAGE (por maior expressão ou ativação), quando cultivadas sobre o colágeno glicado estas células poderiam responder com ativação de Rac1. Curiosamente, nós demonstramos anteriormente que células CHO-K1 cultivadas sobre fibronectina e expostas à glicose elevada também apresentavam maior atividade de Rac1 e menor polaridade (LAMERS et al., 2011). Este efeito era dependente de estresse oxidativo, mas a participação de RAGE não foi avaliada.

O efeito observado sobre o espraiamento inicial não se manteve ao longo do tempo, já que após 24 horas a área de espraiamento era semelhante entre células derivadas de controle e diabéticos, tanto sobre o colágeno normal quanto sobre o colágeno glicado. Diferenças no arranjo de F-actina não foram observadas, mas a imunomarcação para α-actina de músculo liso (α-SMA) foi diferente entre células derivadas de controles e diabéticos. Embora a expressão de α-SMA aparentemente não tenha se alterado, houve maior co-localização de α-SMA com fibras de estresse em células

de diabéticos. Este efeito foi observado sobre colágeno normal e glicado. Foi demonstrado que fibroblastos cardíacos normais frente ao colágeno glicado apresentavam expressão aumentada de α-SMA (YUEN et al., 2010). Por outro lado, fibroblastos cardíacos cultivados em 25 mM de glicose apresentaram menor marcação para α-SMA, porém com uma intensidade maior em sobreposição com fibras de estresse, quando comparamos com o mesmo fibroblasto cultivado em colágeno normal (TALIOR-VOLODARSKY et al., 2014).

A glicação do colágeno prejudicou a migração de fibroblastos derivados de animais controle e diabéticos. As células de diabéticos, que já apresentavam migração deficiente sobre colágeno normal, praticamente não se deslocaram sobre o colágeno glicado. Não temos conhecimento de outro estudo na literatura que tenha avaliado a migração de fibroblastos de diabéticos sobre o colágeno glicado, sob elevada concentração de glicose. O fenótipo celular com menor velocidade, menor direcionalidade e formação de projeções múltiplas e instáveis (compatível com uma intensa ativação de Rac1) já havia sido observado por nós anteriormente (LAMERS et al., 2011). A incapacidade das células de migrar sobre o colágeno glicado, no entanto, sugere um comprometimento de fatores adicionais. Uma possível explicação seria a deficiente expressão de integrinas contendo a subunidade β1.

A interação célula-MEC ocorre por intermédio de diferentes receptores, principalmente integrinas. Integrinas ligantes de colágeno reconhecem sequências específicas de aminoácidos na molécula de colágeno. AGEs acumulam-se aleatoriamente, podendo alterar estes sítios de ligação. Adicionalmente, o acúmulo de AGES pode levar diretamente à formação de ligações cruzadas em componentes da MEC, o que altera o funcionamento adequado de várias outras macromoléculas, bem como sua interação (BU et al., 2010; TAN et al., 2006; WANG et al., 2012). Nossos resultados mostram uma redução da imunomarcação de integrina β1 em fibroblastos derivados de ratos diabéticos sobre o colágeno glicado. Não observamos uma alteração evidente da distribuição de β1 em células de animais controle sobre o colágeno glicado, mas um estudo de Loughlin e Artlett (2009) mostrou que, em colágeno glicado com 3-Deoxyglucosona (3-DG) em gel 3D, houve aumento do RNAm para a subunidade β1 em fibroblastos, acompanhado de

forte adesão ao substrato, migração reduzida, diminuição da expressão proteica de cinase de adesão focal (FAK), da imunolocalização de paxilina e de FAK perinuclear e um aumento do marcador de estresse de reticulo endoplasmático GADD153.

Em outro estudo, foi demonstrado que fibroblastos cardíacos cultivados sobre colágeno glicado in vitro com metilglioxal (MGO) apresentaram aumento da expressão de integrina α11, que compõe um receptor de colágenos. A imunomarcação para esta subunidade, no entanto, mostrou-se presente em adesões menores sobre o colágeno glicado, quando comparado ao colágeno normal. Além disso, essas células apresentaram uma redução de 4x da ligação/avidez da integrina α11β1, sugerindo menor funcionalidade deste receptor (TAILOR-VOLODARSKY et al., 2014). O mesmo estudo mostrou que o colágeno glicado induziu um aumento de TGF-β2, mas não de TGF-β1 ou TGF-β3 (TAILOR-VOLODARSKY et al., 2014). O aumento do TGF- β2 é observado em vários tecidos de animais diabéticos, inclusive glândulas exócrinas, podendo estar relacionado à fibrose (LAMERS et al., 2007).

Em geral, as células são capazes de detectar áreas de maior rigidez na MEC e aumentar sua contratilidade em resposta a este microambiente (LO et al., 2000). Neste estudo mostramos através da técnica de OMTC, que os fibroblastos derivados de ratos diabéticos frente ao colágeno glicado (mais rígido) apresentavam uma diminuição da rigidez do citoesqueleto. Esta tendência já era observada sobre o colágeno normal, mas não foi significativamente diferente. Esse resultado não esperado pode ser resultante da diminuição de integrinas β1, impossibilitando a correta interação com o substrato e resultando em menor sensibilidade da célula à MEC.

Em paralelo à análise dos efeitos do colágeno glicado sobre células de animais controle e diabéticos, decidimos avaliar a contratilidade dos fibroblastos em ambiente com elevada concentração de glicose. Conforme já mencionado na introdução, a contratilidade mediada por miosina II é muito importante para a constituição das fibras de estresse, maturação de adesões à MEC e migração celular.

Observamos previamente que fibroblastos derivados de ratos diabéticos cultivados em gel 3D de colágeno/fibronectina migravam menos que fibroblastos de ratos controle,

mas não apresentavam piora da migração na presença de um inibidor de ROCK (Y27632), ao contrário das células controle (ALMEIDA, 2011). Estes resultados sugeriam que, em condição hiperglicêmica, estes fibroblastos já apresentavam uma deficiência na contratilidade celular. Esta hipótese foi reforçada por outros resultados, como p. ex. o fato de células de diabéticos terem sua velocidade de migração acelerada pela adição de fibronectina exógena, igualando-se à velocidade de células controle, mas continuarem deslocando-se deficientemente em ensaios de transwell, que exigem uma deformação do corpo celular para passagem pelos poros da membrana (em fase de elaboração)[4]. Adicionalmente, as células de diabéticos apresentavam fenótipo semelhante a células com menor contratilidade, tanto em matriz 2D quanto em matriz 3D, p. ex. exibindo caudas alongadas (ALMEIDA, 2011).

O modelo experimental selecionado por nós para estudar os efeitos da glicose elevada sobre a contratilidade celular foi a linhagem de fibroblastos murinos NIH-3T3 cultivada na presença de glicose 30 mM (HG) por 15 dias. Os resultados mostraram que não houve alteração do número de células aderidas ao substrato (fibronectina) e na área de espraiamento celular inicial (1 hora). Este resultado foi diferente do observado por nós previamente com fibroblastos derivados de ratos diabéticos, que apresentaram o mesmo número de células aderidas, mas com menor espraiamento inicial (ALMEIDA, 2011). Esta dificuldade inicial no espraiamento era, no entanto, compensada ao longo de 24 horas.

O citoesqueleto de células cultivadas em HG apresentava menos fibras de estresse e as células apresentavam caudas longas na parte posterior, sugerindo contratilidade deficiente. Em matriz 2D de fibronectina a velocidade de migração foi reduzida em 34% pela glicose elevada, acompanhada de um aumento de 60% na direcionalidade. Não houve diferença na distância relativa. O citoesqueleto das células em matriz 2D também sugere menor contratilidade após exposição à HG, o que poderia envolver miosina II e a via de Rho GTPases, principalmente Rho A. Em nossos resultados utilizando inibidores de cinases observamos diferentes efeitos de ML-7 e Y27632 sobre as células LOW e HIGH. O

[4] Almeida MES, Monteiro KS, Kato EE, Sampaio SC, Braga TT, Camara NOS, Lamers ML, Santos MF. Diabetes Mellitus Reduces the Cell Surface Expression of Fibronectin Receptors in Rat Dermal Fibroblasts and Impairs Cell Adhesion and Migration. 2015

inibidor de ROCK teve um efeito sobre as células LOW + Y27632, modificando sua morfologia e, já em células HIGH + Y27632, não houve mudança adicional, as células continuavam semelhantes às células HIGH (semelhante ao que foi observado por ALMEIDA, 2011 em células 3D). Com essa ausência de alteração das células HIGH + Y27632 podemos sugerir que a alta concentração de glicose por si só altera a morfologia das células HIGH, possivelmente em alguma via de sinalização envolvendo a inibição de ROCK.

Ao utilizarmos o inibidor de MLCK (ML-7) observamos que em células HIGH + ML-7 houve uma mudança na morfologia, com fenótipo semelhante ao de uma célula LOW + DMSO. Além disso, a velocidade de migração das células HIGH + ML-7 aumentou comparando tanto com as células LOW + ML-7 e com células LOW + DMSO. Quando adicionamos os dois inibidores de cinases juntos (ML-7 e Y27632), observamos uma mudança evidente no citoesqueleto de actina das células LOW + ML-7 + Y27632 e, já em células HIGH + ML-7 + Y27632 as células não apresentaram mudanças na morfologia. A velocidade de migração estava reduzida em células HIGH + ML-7 + Y27632.

Sabe-se que a regulação da ativação das miosinas ocorre com o balanço de cinases e fosfatases. ROCK é uma cinase efetora de RhoA que fosforila a subunidade MBS inibindo a atividade fosfatase de MLC e aumentando a fosforilação de MII. O inibidor de ROCK (Y27632) atua inibindo tanto ROCK1 quanto ROCK2 em domínios de cinase ATP dependente (LIAO; SETO; NOMA, 2007).

A MLCK é uma cinase pertencente à subfamília da serina/treonina que é regulada pela calmodulina de maneira cálcio dependente. O inibidor ML-7 inibe MLCK através da competição pelo sítio de ATP da proteína cinase C (PKC). Com a utilização do sítio de ATP da PKC pela ML-7, não ocorre a ligação entre Ca^{2+}/calmodulina, não havendo ativação de MLCK. A explicação do fenótipo alterado e da velocidade de migração em células HIGH + ML-7 aumentada pode ser explicado por uma possível alteração da atividade de fosfatase (devido à diminuição de MLCK e ROCK).

Segundo Connell e Helfman (2006) ainda é desconhecido porque células utilizam múltiplas cinases pata fosforilar e ativar miosina II. Trabalhos mostram a atividade independente de MLCK e ROCK em fibroblastos 3T3, onde MLCK é responsável pela

formação de fibras de estresse na periferia da célula e ROCK no centro da célula (TOTSUKAWA et al., 2000). Ainda, foi demostrado que a ativação de ERK pela cascata de Ras era dependente de MLCK e não de ROCK (HELFMAN, PAWLAK, 2005). A ativação de ROCK é também necessária para a sobrevivência de alguns tipos celulares (LI et al., 2002), indicando que os efeitos do uso de inibidores são tipo celular específico. Segundo Connell e Helfman (2006), sugerem-se papéis distintos para ROCK e MLCK na sobrevivência celular em células epiteliais, sendo essa dependente de MLCK e não de ROCK. .

A morfologia com caudas alongadas tem sido associada à menor contratilidade em diferentes tipos celulares. Em células de fibroma, p. ex., a inibição de ROCK alterou a distribuição de vinculina (proteína de adesão) e F-actina, mantendo-se a sua organização na periferia e desorganizando no centro celular (TOTSUKAWA et al., 2004). Segundo Vicente-Manzanares et al. (2008), células deficientes de MIIA exibem largos lamelipódios e não retraem a parte traseira do corpo celular, resultando numa cauda longa. Esse fenótipo também foi observado em macrófagos sob efeito do inibidor de ROCK (WORTHYLAKE et al., 2001). Em nosso trabalho, uma observação interessante foi o aumento da direcionalidade das células sob HG, talvez associada à cauda longa. Este resultado foi diferente daquele observado com fibroblastos primários, que não apresentavam diferenças na direcionalidade em HG. Acreditamos que a baixa direcionalidade de células NIH-3T3 LOW, quando comparadas aos fibroblastos primários, explique esta observação. Também não houve alteração na polaridade das células expostas a HG, diferentemente do resultado observado previamente por nós em células CHO-K1 (LAMERS et al., 2011).

As matrizes 3D têm sido utilizadas como modelos mais próximos ao microambiente fisiológico de fibroblastos, já que as células encontram-se imersas na matriz e a polaridade dorso-ventral observada em matrizes 2D é eliminada. Em estudo anterior observamos uma redução de aproximadamente 56% na velocidade de migração de fibroblastos derivados de ratos diabéticos em matriz de colágeno/fibronectina (ALMEIDA, 2011). Estudos comparando o comportamento celular em 2D e 3D revelaram diferenças na morfologia, migração, adesão e sinalização. A distribuição de F-actina em 2D

é marcadamente presente nas células, enquanto que em 3D as fibras de estresse são poucas, delgadas e mais perifericamente localizadas (HAKKINEN et al., 2011). No presente estudo as células NIH-3T3 cultivadas em meio HG e matriz 3D de colágeno/fibronectina apresentaram mais protrusões, mais espículas ou filopódios, muitas vezes não estabelecendo uma polaridade definida. Este fenótipo é compatível com aquele apresentado por células tratadas com blebistatina, um inibidor de miosina II (resultados não publicados).

Em fibroblastos, existem duas principais formas de miosina II descritas, MIIA e MIIB, que possuem diferentes funções na regulação da atividade contrátil e na localização celular (KOLEGA, 1998; KIM et al., 2005). Tanto miosina IIA quanto miosina IIB atuam na formação de fibras de estresse (WEI; ADELSTEIN, 2000; BAO; JANA; ADELSTEIN, 2005). A MIIB controla a estabilidade da protrusão, enquanto a MIIA está envolvida na regulação do fluxo retrógrado de actina (CAI et al., 2006). Especificamente, miosina IIA realiza a retração da cauda durante a migração (CHRZANOWSKA-WODNICKA; BURRIDGE, 1996; WORTHYLAKE et al., 2001), enquanto a MIIB regula o posicionamento do núcleo e do centro organizador de microtúbulos (MCOT) (GOMES; JANI; GUNDERSEN, 2005). As células sem MIIB apresentavam protrusões multidirecionais, perda de polaridade e localização alterada de Golgi e MTOC (LO et al., 2004).

Neste estudo, a expressão proteica de MIIA e MIIB não foi alterada pela glicose elevada, embora a fosforilação de MLC estivesse reduzida, confirmando uma menor atividade de miosina II. A distribuição de MIIB, antes restrita ao corpo celular e porção traseira das células, tornou-se difusa por todo o corpo celular e protrusões. As diferenças já descritas de função e localização entre MIIA e MIIB podem explicar a alteração pela alta concentração de glicose apenas na localização de MIIB, e não de MIIA.

Relatos na literatura relacionando miosina II e diabetes são escassos. A expressão de miosina IIB em cérebro de ratos diabéticos mostrou-se maior quando comparada à expressão em cérebro de ratos não diabéticos (CALÁBRIA et al., 2011). Em cérebro de ratos diabéticos, a MIIB estava localizada na região do hipocampo e no córtex pré-frontal; Ainda, o tratamento com um hipoglicemiante oral modificou a reduzindo sua marcação

nessas regiões (DA COSTA et al., 2014). Interessantemente, em astrócitos, o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio promoveu uma reorganização do citoesqueleto e um aumento da associação de filamentos de actina e miosina (ZHU et al., 2005). De fato, miosina parece ser particularmente sensível a danos causados pelo estresse oxidativo (ARAGNO et al., 2004; COIRAULT et al., 2007). Nós reportamos anteriormente que alterações na migração celular e no citoesqueleto de actina, promovidas pela atividade aumentada da GTPases Rac1, eram dependentes do estresse oxidativo promovido pela glicose elevada (LAMERS et al., 2011). Naquele estudo, curiosamente, a atividade de RhoA também mostrou-se aumentada em células CHO-K1, mas promovida pela osmolaridade da glicose e não pelo estresse oxidativo. Mesmo com Rho A mais ativa, as células não apresentavam fenótipo de contratilidade aumentada, pelo contrário: a maturação das adesões junto à MEC, um processo dependente de MII, estava reduzida (LAMERS et al., 2011).

A redução de fosforilação de MLC em fibroblastos cultivados em meio HG sugere redução da contratilidade celular, e este resultado foi corroborado pelos experimentos utilizando Traction Force Microscopy (TFM), que mostraram uma menor força exercida por estas células sobre o substrato por meio de suas adesões. A fosforilação de MLC é regulada principalmente pela ação de duas cinases, ROCK e MLCK, e também pela fosfatase de MLC (MLCP). Uma vez fosforilada, a MII interage com a actina para formação de fibras de estresse e outras estruturas contráteis. Não sabemos ao certo qual a localização de MLC fosforilada em nossas células em meio HG.

Finalmente, os resultados de TFM demonstrando uma menor tensão exercida pelas células sobre o substrato poderia também estar relacionado a uma menor expressão de integrinas na superfície celular. Fibroblastos derivados de ratos diabéticos apresentaram menor expressão de integrinas αv e α5 na superfície (em fase de elaboração) [5]. Adicionalmente, a alteração da localização de MIIB também poderia contribuir para a redução da tensão exercida no substrato. A montagem inicial das

[5] Almeida MES, Monteiro KS, Kato EE, Sampaio SC, Braga TT, Camara NOS, Lamers ML, Santos MF. Diabetes Mellitus Reduces the Cell Surface Expression of Fibronectin Receptors in Rat Dermal Fibroblasts and Impairs Cell Adhesion and Migration. 2015

adesões é mecanisticamente e cineticamente ligada à polimerização de actina no lamelipódio, onde a MII exerce tensão através da mudança conformacional exercida sobre as proteínas dos complexos de adesão, contribuindo para a maturação das adesões. Além disso, a formação de fibras de estresse também contribui para a maturação e estabilidade das adesões. Segundo Vicente-Manzanares et al., 2008, MII mutantes que ainda formam fibras de estresse e ligam-se à actina, mas não possuem sua atividade motora, induzem a formação de adesões focais, sugerindo que o arranjo das fibras de estresse, e não apenas a contratilidade, são importantes para a formação das adesões.

Resultados obtidos neste trabalho nos ajudam a elucidar como a alta concentração de glicose *in vitro* pode alterar os eventos que regulam a migração deficiente de fibroblastos. Informações sobre a regulação do citoesqueleto em fibroblastos expostos à glicose elevada, assim como informações sobre o comportamento destas células derivadas de animais controle e diabéticos frente a uma matriz modificada pela glicose elevada, mais próximo do que ocorre in vivo, contribuem significativamente para uma melhor compreensão da cicatrização deficiente na pele de indivíduos diabéticos.

7 CONCLUSÕES

- A glicação do colágeno I com ácido glioxílico aumentou a rigidez e reduziu a elasticidade do colágeno, com a maior presença de AGEs totais e ligações cruzadas e menor disponibilidade de aminas livres. A glicação não impediu a polimerização do colágeno, embora o aspecto do gel tenha sido modificado, com o aparecimento de fibras mais grossas e grumos.

- O colágeno glicado *in vitro* por ácido glioxílico afetou negativamente a migração de fibroblastos provenientes de ratos normais e, principalmente, de fibroblastos derivados de ratos diabéticos. De forma geral, houve maior lentidão no espraiamento celular e formação de protrusões. Em células derivadas de diabéticos houve redução da proliferação e alteração de adesões celulares, com grande redução da integrina β1 nestas adesões. As células apresentaram também uma menor rigidez do citoesqueleto.

- A alta concentração de glicose reduziu a contratilidade em fibroblastos NIH-3T3, demonstrada pela menor fosforilação da cadeia leve de miosina II e por uma menor tensão exercida pelas células sobre o substrato. A expressão de isoformas Miosina IIA e IIB não foi alterada. Já a distribuição de miosina IIB foi modificada, tornando-se mais difusa nas células, inclusive em processos celulares.

REFERÊNCIAS*

AHMED, N. et al. Glycated and oxidized protein degradation products are indicators of fasting and postprandial hyperglycemia in diabetes. **Diabetes Care,** v. 28, n. 10, p. 2465-2471, Oct 2005. ISSN 0149-5992. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16186281 >.

ALIKHANI, M. et al. Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor. **Am J.Physiol Cell Physiol.,** v. 292, n. 2, p. C850-C856, Feb 2007. ISSN 0363-6143. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17005604 >.

ALMEIDA, M. E. S. Hiperglicemia e interação fibroblasto-matriz extracelular-influências na adesão e migração em substratos bidimensional e tridimensional. 2011. 83 f (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)- Instituto de Ciências Biomédicas- Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

ARAGNO, M. et al. Oxidative stress impairs skeletal muscle repair in diabetic rats. **Diabetes,** v. 53, n. 4, p. 1082-1088, Apr 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15047625 >.

ARONSON, D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. **J. Hypertens.,** v. 21, n. 1, p. 3-12, Jan 2003. ISSN 0263-6352. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12544424 >.

AVERY, N. C.; BAILEY, A. J. The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. **Pathol Biol (Paris),** v. 54, n. 7, p. 387-395, Sep 2006. ISSN 0369-8114. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16962252 >.

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

BACZYK, M.; CARRACEDO S.; GULLBERG D. Integrins. **Cell Tissue Res**, v. 339, p.269-280, 2010. ISSN 1432-0878. Disponível em: <>.

BAO, J.; JANA, S. S.; ADELSTEIN, R. S. Vertebrate nonmuscle myosin II isoforms rescue small interfering RNA-induced defects in COS-7 cell cytokinesis. **J. Biol Chem.,** v. 280, n. 20, p. 19594-19599, May 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15774463 >.

BAUMGARTNER-PARZER, S. M. et al. Modulation by high glucose of adhesion molecule expression in cultured endothelial cells. **Diabetologia,** v. 38, n. 11, p. 1367-1370, Nov 1995. ISSN 0012-186X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8582548 >.

BETAPUDI, V. Life without double-headed non-muscle myosin II motor proteins. **Front Chem,** v. 2, p. 45, 2014. ISSN 2296-2646. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25072053 >.

BLOCK, J. et al. Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3. **J. Microsc.,** v. 231, n. 3, p. 506-517, Sep 2008. ISSN 1365-2818. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18755006 >.

BRODSKY, B.; BAUM, J. Modelling collagen desease. **Nature,** v. 453, n. 19, p. 998-999. Disponível em <http://www.nature.com/nature/journal/v453/n7198/fig_tab/453998a_F1.html>.

BROWN, M. J.; LOEW, L. M. Electric field-directed fibroblast locomotion involves cell surface molecular reorganization and is calcium independent. **J. Cell Biol.,** v. 127, n. 1, p. 117-128, Oct 1994. ISSN 0021-9525. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929557 >.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature,** v. 414, n. 6865, p. 813-820, Dec 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742414 >.

BU, D. X. et al. Activation of the ROCK1 branch of the transforming growth factor-beta pathway contributes to RAGE-dependent acceleration of atherosclerosis in diabetic ApoE-null mice. **Circ Res,** v. 106, n. 6, p. 1040-1051, Apr 2010. ISSN 1524-4571. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133903 >.

CAI, Y. et al. Nonmuscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow. **Biophys J.,** v. 91, n. 10, p. 3907-3920, Nov 2006. ISSN 0006-3495. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920834 >.

CALÁBRIA, L. K. et al. Overexpression of myosin-IIB in the brain of a rat model of streptozotocin-induced diabetes. **J. Neurol Sci.,** v. 303, n. 1-2, p. 43-49, Apr 2011. ISSN 1878-5883. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21306737 >.

CARPENTER, C. L. et al. Lipid kinases are novel effectors of the GTPase Rac1. **Adv Enzyme Regul,** v. 39, p. 299-312, 1999. ISSN 0065-2571. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10470380 >.

CHARRAS, G.; SAHAI, E. Physical influences of the extracellular environment on cell migration. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 15, n. 12, p. 813-824, Dec 2014. ISSN 1471-0080. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25355506 >.

CHEN, A. C. et al. Induction of advanced glycation end products and alterations of the tensile properties of articular cartilage. **Arthritis Rheum,** v. 46, n. 12, p. 3212-3217, Dec 2002. ISSN 0004-3591. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12483725 >.

CHOQUET, D.; FELSENFELD, D. P.; SHEETZ, M. P. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. **Cell,** v. 88, n. 1, p. 39-48, Jan 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9019403 >.

CHRZANOWSKA-WODNICKA, M.; BURRIDGE, K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. **J. Cell Biol.,** v. 133, n. 6, p. 1403-1415, Jun 1996. ISSN 0021-9525. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8682874 >.

COIRAULT, C. et al. Oxidative stress of myosin contributes to skeletal muscle dysfunction in rats with chronic heart failure. **Am J. Physiol Heart Circ Physiol.,** v. 292, n. 2, p. H1009-

H1017, Feb 2007. ISSN 0363-6135. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17040975 >.

CONNELL, L. E.; HELFMAN, D. M. Myosin light chain kinase plays a role in the regulation of epithelial cell survival. **J Cell Sci,** v. 119, n. Pt 11, p. 2269-81, Jun 2006. ISSN 0021-9533. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16723733 >.

CONGET, P. et al. Replenishment of type VII collagen and re-epithelialization of chronically ulcerated skin after intradermal administration of allogeneic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **Cytotherapy,** v. 12, n. 3, p. 429-431, May 2010. ISSN 1477-2566. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20230217 >.

DA COSTA, A. V. et al. Glibenclamide treatment modulates the expression and localization of myosin-IIB in diabetic rat brain. **J. Neurol Sci.,** v. 340, n. 1-2, p. 159-164, May 2014. ISSN 1878-5883. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24725740 >.

DANUSER, G. Testing the lamella hypothesis: the next steps on the agenda. **J. Cell Sci.,** v. 122, n. Pt 12, p. 1959-1962, Jun 2009. ISSN 0021-9533. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19494124 >.

DEGENHARDT, T. P.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand),** v. 44, n. 7, p. 1139-1145, Nov 1998. ISSN 0145-5680. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9846896 >.

DeMali, K. A.; Sun, X.; Bui, G. A. Force transmission at cell-cell and cell-matrix adhesions. **Biochemistry,** v. 53, n. 49, p. 7706-7717, Dec 2014. ISSN 1520-4995. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25474123 >.

DEVECI, M. et al. Glutathione enhances fibroblast collagen contraction and protects keratinocytes from apoptosis in hyperglycaemic culture. **Br J. Dermatol.,** v. 152, n. 2, p. 217-224, Feb 2005. ISSN 0007-0963. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15727631 >.

DISCHER, D. E.; JANMEY, P.; WANG, Y. L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. **Science,** v. 310, n. 5751, p. 1139-1143, Nov 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16293750 >.

Dugina, V. et al. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. **J. Cell Sci.,** v. 114, n. Pt 18, p. 3285-3296, Sep 2001. ISSN 0021-9533. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591817 >.

ERICKSON, C. A.; NUCCITELLI, R. Embryonic fibroblast motility and orientation can be influenced by physiological electric fields. **J. Cell Biol.,** v. 98, n. 1, p. 296-307, Jan 1984. ISSN 0021-9525. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6707093 >.

ESPOSITO, C.; CAPUTO, I. Mammalian transglutaminases. Identification of substrates as a key to physiological function and physiopathological relevance. **FEBS J,** v. 272, n. 3, p. 615-631, Feb 2005. ISSN 1742-464X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15670145 >.

FALANGA, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **Lancet,** v. 366, n. 9498, p. 1736-1743, Nov 2005. ISSN 1474-547X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16291068 >.

FRANCIS-SEDLAK, M. E. et al. Characterization of type I collagen gels modified by glycation. **Biomaterials,** v. 30, n. 9, p. 1851-1856, Mar 2009. ISSN 1878-5905. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19111897 >.

GABBIANI, G.; RYAN, G. B.; MAJNE, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia,** v. 27, n. 5, p. 549-550, May 1971. ISSN 0014-4754. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5132594 >.

GASIOROWSKI, J. Z.; MURPHY, C. J.; NEALEY, P. F. Biophysical cues and cell behavior: the big impact of little things. **Annu Rev Biomed Eng,** v. 15, p. 155-176, 2013. ISSN 1545-4274. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23862676 >.

GAUTIERI, A. et al. Age- and diabetes-related nonenzymatic crosslinks in collagen fibrils: candidate amino acids involved in Advanced Glycation End-products. **Matrix Biol,** v. 34, p. 89-95, Feb 2014. ISSN 1569-1802. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24060753 >.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ Res,** v. 107, n. 9, p. 1058-1070, Oct 2010. ISSN 1524-4571. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21030723 >.

GIANNONE, G. et al. Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. **Cell,** v. 116, n. 3, p. 431-443, Feb 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15016377 >.

GOLDIN, A. et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation,** v. 114, n. 6, p. 597-605, Aug 2006. ISSN 1524-4539. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16894049 >.

GOMES, E. R.; JANI, S.; GUNDERSEN, G. G. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. **Cell,** v. 121, n. 3, p. 451-463, May 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15882626 >.

HAKKINEN, K. M. et al. Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices. **Tissue Eng Part A,** v. 17, n. 5-6, p. 713-724, Mar 2011. ISSN 1937-335X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20929283 >.

HALL, A. G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. **Science,** v. 280, n. 5372, p. 2074-2075, Jun 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9669963 >.

_____. Rho family GTPases. **Biochem Soc Trans,** v. 40, n. 6, p. 1378-1382, Dec 2012. ISSN 1470-8752. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23176484 >.

HALLIDAY, N. L.; TOMASEK, J. J. Mechanical properties of the extracellular matrix influence fibronectin fibril assembly in vitro. **Exp Cell Res,** v. 217, n. 1, p. 109-117, Mar 1995. ISSN 0014-4827. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7867709 >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell,** v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931 >.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell,** v. 144, n. 5, p. 646-674, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230 >.

HANSEN, M. D.; NELSON, W. J. Serum-activated assembly and membrane translocation of an endogenous Rac1:effector complex. **Curr Biol,** v. 11, n. 5, p. 356-360, Mar 2001. ISSN 0960-9822. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11267873 >.

HARTOG, J. W. et al. Accumulation of advanced glycation end products, measured as skin autofluorescence, in renal disease. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1043, p. 299-307, Jun 2005. ISSN 0077-8923. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16037252 >.

HELFMAN, D. M.; PAWLAK, G. Myosin light chain kinase and acto-myosin contractility modulate activation of the ERK cascade downstream of oncogenic Ras. **J Cell Biochem,** v. 95, n. 5, p. 1069-80, Aug 2005. ISSN 0730-2312. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15962288 >.

HELOU, C. et al. Microorganisms and Maillard reaction products: a review of the literature and recent findings. **Amino Acids,** v. 46, n. 2, p. 267-277, Feb 2014. ISSN 1438-2199. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23588491 >.

HIROSE, A. et al. Advanced glycation end products increase endothelial permeability through the RAGE/Rho signaling pathway. **FEBS Lett,** v. 584, n. 1, p. 61-66, Jan 2010. ISSN 1873-3468. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19944695 >.

HOTULAINEN, P.; LAPPALAINEN, P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. **J. Cell Biol.,** v. 173, n. 3, p. 383-394, May 2006. ISSN 0021-9525. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16651381 >.

HUMPHRIES, J. D.; BYRON, A.; HUMPHRIES, M. J. Integrin ligands at a glance. **J. Cell Sci.,** v. 119, n. Pt 19, p. 3901-3903, Oct 2006. ISSN 0021-9533. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988024 >.

HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science,** v. 326, n. 5957, p. 1216-1269, Nov 2009. ISSN 1095-9203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19965464 >.

HUDSON, B. I. et al. Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. **J Biol Chem,** v. 283, n. 49, p. 34457-34468, Dec 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18922799 >.

JUNQUEIRA L. C, CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12 ed. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan. 2013.

KEMENY, S. F. et al. Glycated collagen alters endothelial cell actin alignment and nitric oxide release in response to fluid shear stress. **J. Biomech.,** v. 44, n. 10, p. 1927-1935, Jul 2011. ISSN 1873-2380. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21555127 >.

KEREN, K. et al. Mechanism of shape determination in motile cells. **Nature,** v. 453, n. 7194, p. 475-480, May 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497816 >.

KERN, J. S. et al. Forty-two novel COL7A1 mutations and the role of a frequent single nucleotide polymorphism in the MMP1 promoter in modulation of disease severity in a large European dystrophic epidermolysis bullosa cohort. **Br J. Dermatol.,** v. 161, n. 5, p. 1089-1097, Nov 2009. ISSN 1365-2133. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19681861 >.

KIM, K. Y. et al. Disease-associated mutations and alternative splicing alter the enzymatic and motile activity of nonmuscle myosins II-B and II-C. **J. Biol Chem.,** v. 280, n. 24, p. 22769-22775, Jun 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845534 >.

KLEIN, T.; Bischoff, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. **Amino Acids,** v. 41, n. 2, p. 271-290, Jul 2011. ISSN 1438-2199. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20640864 >.

KNAPOWSKI, J.; WIECZOROWSKA-TOBIS, K.; WITOWSKI, J. Pathophysiology of ageing. **J. Physiol Pharmacol.,** v. 53, n. 2, p. 135-146, Jun 2002. ISSN 0867-5910. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12120891 >.

KOESTLER, S. A. et al. Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front. **Nat Cell Biol,** v. 10, n. 3, p. 306-313, Mar 2008. ISSN 1476-4679. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18278037 >.

KOLEGA, J. Cytoplasmic dynamics of myosin IIA and IIB: spatial 'sorting' of isoforms in locomoting cells. **J. Cell Sci.,** v. 111 (Pt 15), p. 2085-2095, Aug 1998. ISSN 0021-9533. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9664030 >.

KOVÁCS, M. et al. Load-dependent mechanism of nonmuscle myosin 2. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 104, n. 24, p. 9994-9999, Jun 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548820 >.

_____. Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform. **J Biol Chem,** v. 278, n. 40, p. 38132-38140, Oct 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12847096 >.

LAMERS, M. L. et al. High Glucose-Mediated Oxidative Stress Impairs Cell Migration. **Plos One,** v. 6, n. 8, p. 9, Aug 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000293558900039 >.

_____. Chronic hyperglycaemia increases TGFbeta2 signaling and the expression of extracellular matrix proteins in the rat parotid gland. **Matrix Biol,** v. 26, n. 7, p. 572-582, Sep 2007. ISSN 0945-053X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17574405 >.

LAPOLLA, A.; BASSO, E.; TRALDI, P. Mass spectrometry of advanced glycation end products. **Adv Clin Chem,** v. 40, p. 165-217, 2005. ISSN 0065-2423. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16355923 >.

LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: a physically integrated molecular process. **Cell,** v. 84, n. 3, p. 359-369, Feb 1996. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608589 >.

LEDERER, M. O.; BÜHLER, H. P. Cross-linking of proteins by Maillard processes--characterization and detection of a lysine-arginine cross-link derived from D-glucose.

Bioorg Med Chem, v. 7, n. 6, p. 1081-1088, Jun 1999. ISSN 0968-0896. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428377 >.

LEITINGER, B.; HOHENESTER, E. Mammalian collagen receptors. **Matrix Biol,** v. 26, n. 3, p. 146-155, Apr 2007. ISSN 0945-053X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17141492 >.

LERMAN, O. Z. et al. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. **Am J. Pathol.,** v. 162, n. 1, p. 303-312, Jan 2003. ISSN 0002-9440. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507913 >.

LI, X. et al. Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. **J Biol Chem,** v. 277, n. 18, p. 15309-16, May 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839765 >.

LIAO, H.; ZAKHALEVA, J.; CHEN, W. Cells and tissue interactions with glycated collagen and their relevance to delayed diabetic wound healing. **Biomaterials,** v. 30, n. 9, p. 1689-1696, Mar 2009. ISSN 1878-5905. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19157537 >.

LIAO H. et al. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. **Biophys J,** v. 79, n. 1, p. 144-152, Jul 2000. ISSN 0006-3495. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10866943 >.

LIAO, J. K.; SETO, M.; NOMA, K. Rho kinase (ROCK) inhibitors. **J Cardiovasc Pharmacol,** v. 50, n. 1, p. 17-24, Jul 2007. ISSN 0160-2446. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17666911 >.

LO, C. M. et al. Nonmuscle myosin IIb is involved in the guidance of fibroblast migration. **Mol Biol Cell,** v. 15, n. 3, p. 982-989, Mar 2004. ISSN 1059-1524. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14699073 >.

_____. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. **Biophys J.,** v. 79, n. 1, p. 144-152, Jul 2000. ISSN 0006-3495. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10866943 >.

LOOT, 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. **Eur J. Cell Biol.,** v. 81, n. 3, p. 153-160, Mar 2002. ISSN 0171-9335. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11998867 >.

LOOTS, M. A. et al. Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation. **Arch Dermatol Res,** v. 291, n. 2-3, p. 93-99, 1999 Feb-Mar 1999. ISSN 0340-3696. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195396 >.

LOUGHLIN, D. T.; ARTLETT, C. M. 3-Deoxyglucosone-collagen alters human dermal fibroblast migration and adhesion: implications for impaired wound healing in patients with diabetes. **Wound Repair Regen,** v. 17, n. 5, p. 739-749, 2009 Sep-Oct 2009. ISSN 1524-475X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19769726 >.

LOWE, B. The role of Ca2+ in deflection-induced excitation of motile, mechanoresponsive balancer cilia in the ctenophore statocyst. **J. Exp Biol.,** v. 200, n. Pt 11, p. 1593-1606, Jun 1997. ISSN 0022-0949. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202448 >.

MADAULE, P.; AXEL, R. A novel ras-related gene family. **Cell,** v. 41, n. 1, p. 31-40, May 1985. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3888408 >.

MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science,** v. 276, n. 5309, p. 75-81, Apr 1997. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082989 >.

MATSUMURA, F. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. **Trends Cell Biol,** v. 15, n. 7, p. 371-377, Jul 2005. ISSN 0962-8924. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15935670 >.

MATTILA, P. K.; LAPPALAINEN, P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 9, n. 6, p. 446-454, Jun 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18464790 >.

MECHAM, R. P. Overview of extracellular matrix. **Curr Protoc Cell Biol,** v. Chapter 10, p. Unit 10.1, Dec 2012. ISSN 1934-2616. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23208544 >.

MEJILLANO, M. R. et al. Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. **Cell,** v. 118, n. 3, p. 363-373, Aug 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15294161 >.

MONNIER, V. M. et al. The mechanism of collagen cross-linking in diabetes: a puzzle nearing resolution. **Diabetes,** v. 45 Suppl 3, p. S67-72, Jul 1996. ISSN 0012-1797. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674897 >.

MORIYA H. T. et al. Citometria ópticomagnética de rotação: exemplo de um método para medir as propriedades reológicas da célula. **21o Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica.** 2008.

MYLLYHARJU, J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. **Trends Genet,** v. 20, n. 1, p. 33-43, Jan 2004. ISSN 0168-9525. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698617 >.

NABA, A. et al. The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. **Mol Cell Proteomics,** v. 11, n. 4, p. M111.014647, Apr 2012. ISSN 1535-9484. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22159717 >.

NEELY, A. N. et al. Gelatinase activities in wounds of healing-impaired mice versus wounds of non-healing-impaired mice. **J. Burn Care Rehabil,** v. 21, n. 5, p. 395-402, 2000 Sep-Oct 2000. ISSN 0273-8481. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11020045 >.

NGUYEN, S.; PASCARIU, M.; GHITESCU, L. Early glycation products of endothelial plasma membrane proteins in experimental diabetes. **Biochim Biophys Acta,** v. 1762, n. 1, p. 94-102, Jan 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139995 >.

NIYIBIZI, C.; LI, F. Potential implications of cell therapy for osteogenesis imperfecta. **Int J. Clin Rheumtol,** v. 4, n. 1, p. 57-66, Feb 2009. ISSN 1758-4272. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20490372 >.

PAGEON, H. et al. Collagen glycation triggers the formation of aged skin in vitro. **Eur J. Dermatol,** v. 17, n. 1, p. 12-20, 2007 Jan-Feb 2007. ISSN 1167-1122. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17324821 >.

_____. Skin aging by glycation: lessons from the reconstructed skin model. **Clin Chem Lab Med,** v. 52, n. 1, p. 169-174, Jan 2014. ISSN 1434-6621. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770560 >.

PASZEK, M. J.; WEAVER, V. M. The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy. **J. Mammary Gland Biol Neoplasia,** v. 9, n. 4, p. 325-342, Oct 2004. ISSN 1083-3021. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15838603 >.

PASZEK, M. J. et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. **Cancer Cell,** v. 8, n. 3, p. 241-254, Sep 2005. ISSN 1535-6108. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169468 >.

PENNACCHI, P. et al. Glycated reconstructed human skin as a plataform to study pathogenesis os skin aging. Tissue Engineering. 2015

PIRILÄ, E. et al. Collagenase-2 (MMP-8) and matrilysin-2 (MMP-26) expression in human wounds of different etiologies. **Wound Repair Regen,** v. 15, n. 1, p. 47-57, 2007 Jan-Feb 2007. ISSN 1067-1927. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244319 >.

PONTI, A. et al. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. **Science,** v. 305, n. 5691, p. 1782-1786, Sep 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15375270 >.

REIGLE, K. L. et al. Non-enzymatic glycation of type I collagen diminishes collagen-proteoglycan binding and weakens cell adhesion. **J. Cell Biochem.,** v. 104, n. 5, p. 1684-98, Aug 2008. ISSN 1097-4644. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18348167 >.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harb Perspect Biol,** v. 3, n. 1, p. a004978, Jan 2011. ISSN 1943-0264. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21421911 >.

RIENTO, K.; RIDLEY, A. J. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 4, n. 6, p. 446-456, Jun 2003. ISSN 1471-0072. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778124 >.

ROJAS, A. M. et al. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. **J. Cell Biol.,** v. 196, n. 2, p. 189-201, Jan 2012. ISSN 1540-8140. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22270915 >.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Dev Biol,** v. 341, n. 1, p. 126-140, May 2010. ISSN 1095-564X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854168 >.

SARANAK, J.; FOSTER, K. W. Rhodopsin guides fungal phototaxis. **Nature,** v. 387, n. 6632, p. 465-466, May 1997. ISSN 0028-0836. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9168108 >.

SCHWARZBAUER, J. E.; SECHLER, J. L. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. **Curr Opin Cell Biol,** v. 11, n. 5, p. 622-627, Oct 1999. ISSN 0955-0674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508649 >.

SELL, D. R. et al. Glucosepane is a major protein cross-link of the senescent human extracellular matrix. Relationship with diabetes. **J. Biol Chem.,** v. 280, n. 13, p. 12310-12315, Apr 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677467 >.

SIMM, A. et al. Advanced glycation endproducts: a biomarker for age as an outcome predictor after cardiac surgery? **Exp Gerontol,** v. 42, n. 7, p. 668-675, Jul 2007. ISSN 0531-5565. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17482402 >.

SINGH, V. P. et al. Advanced glycation end products and diabetic complications. **Korean J. Physiol Pharmacol,** v. 18, n. 1, p. 1-14, Feb 2014. ISSN 1226-4512. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24634591 >.

SPRAVCHIKOV, N. et al. Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. **Diabetes,** v. 50, n. 7, p. 1627-1635, Jul 2001. ISSN 0012-1797. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11423485 >.

TALIOR-VOLODARSKY, I. et al. Glycated collagen induces α11 integrin expression through TGF-β2 and Smad3. **J. Cell Physiol.**, Jun 2014. ISSN 1097-4652. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24962729 >.

TAN, I. et al. A tripartite complex containing MRCK modulates lamellar actomyosin retrograde flow. **Cell,** v. 135, n. 1, p. 123-136, Oct 2008. ISSN 1097-4172. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854160 >.

TAN, K. C. et al. Association between serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and circulating advanced glycation end products in type 2 diabetes. **Diabetologia,** v. 49, n. 11, p. 2756-2762, Nov 2006. ISSN 0012-186X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16969649 >.

TOTSUKAWA, G. et al. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. **J. Cell Biol.,** v. 164, n. 3, p. 427-439, Feb 2004. ISSN 0021-9525. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757754 >.

_____. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. **J. Cell Biol.,** v. 150, n. 4, p. 797-806, Aug 2000. ISSN 0021-9525. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10953004 >.

TSCHUMPERLIN D. J. Fibroblast and the ground of walk on. **Phys.,** v. 28, p. 380-390, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24186933>

VAALAMO, M. et al. Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. **J. Invest Dermatol.,** v. 109, n. 1, p. 96-101, Jul 1997. ISSN 0022-202X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9204962 >.

VALLOTTON, P.; Small, J. V. Shifting views on the leading role of the lamellipodium in cell migration: speckle tracking revisited. **J. Cell Sci.,** v. 122, n. Pt 12, p. 1955-1958, Jun 2009. ISSN 0021-9533. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19494123 >.

VICENTE-MANZANARES, M. et al. Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. **J. Cell Biol.,** v. 183, n. 3, p. 543-554, Nov 2008. ISSN 1540-8140. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955554 >.

_____. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 10, n. 11, p. 778-790, Nov 2009. ISSN 1471-0080. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19851336 >.

_____. Myosin IIA/IIB restrict adhesive and protrusive signaling to generate front-back polarity in migrating cells. **J. Cell Biol.,** v. 193, n. 2, p. 381-396, Apr 2011. ISSN 1540-8140. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21482721 >.

_____. Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. **J. Cell Biol.,** v. 176, n. 5, p. 573-580, Feb 2007. ISSN 0021-9525. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312025 >.

WWW.MECHANOBIO.INFO. Acessado em: 01 de junho de 2015.

WANG, J. et al. RhoA/ROCK-dependent moesin phosphorylation regulates AGE-induced endothelial cellular response. **Cardiovasc Diabetol,** v. 11, p. 7, 2012. ISSN 1475-2840. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22251897 >.

WANG, N.; Butler, J. P.; Ingber, D. E. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. **Science,** v. 260, n. 5111, p. 1124-1127, May 1993. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7684161 >.

WANG, Z. et al. Clinical significance and pathogenic role of anti-cardiac myosin autoantibody in dilated cardiomyopathy. **Chin Med J (Engl),** v. 116, n. 4, p. 499-502, Apr 2003. ISSN 0366-6999. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12875710 >.

WEI, Q.; Adelstein, R. S. Conditional expression of a truncated fragment of nonmuscle myosin II-A alters cell shape but not cytokinesis in HeLa cells. **Mol Biol Cell,** v. 11, n. 10, p. 3617-3627, Oct 2000. ISSN 1059-1524. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11029059 >.

WENDT, T. et al. Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 98, n. 8, p. 4361-4366, Apr 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287639 >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2013.

WORTHYLAKE, R. A. et al. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. **J. Cell Biol.,** v. 154, n. 1, p. 147-160, Jul 2001. ISSN 0021-9525. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11448997 >.

YUEN, A. et al. Methylglyoxal-modified collagen promotes myofibroblast differentiation. **Matrix Biol,** v. 29, n. 6, p. 537-548, Jul 2010. ISSN 1569-1802. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20423729 >.

ZHU, D. et al. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. **J. Cell Sci.,** v. 118, n. Pt 16, p. 3695-3703, Aug 2005. ISSN 0021-9533. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16046474 >.

ANEXOS

QUADRO ESQUEMÁTICO COM RESUMOS DOS RESULTADOS:

1.

Diabetes

Colágeno Normal: Células Controles (C) X Células Diabéticas (D)	Efeitos do DM
Proliferação	*Não há diferença*
Adesão/espraiamento (1 h)	*Não há diferença de morfologia e área*
Protrusões	*C= única* *D= múltipla*
Área e F-actina (24 h)	*Não há diferença de morfologia e área*
α-SMA	*C= marcação difusa e não há sobreposição com F-actina* *D= intensa marcação com sobreposição com F-actina*
Migração	*Redução de 44% em D* *Direcionalidade não mudou* *Distância relativa diminui 44% em D*
β1	*Não há diferença*
OMTC	*Não há diferença*

2.

Glicação do colágeno tipo I

Colágeno I Glicado: Células Controles (C) X Células Diabéticas (D)	
Proliferação	*Diminui após 72 horas em D*
Adesão/espraiamento (1 h)	*Não há diferença de morfologia e área*
Protrusões	*C= única* *D= múltipla*
Área e F-actina (24 h)	*Não há diferença de morfologia e área*
α-SMA	*C= marcação difusa e não há sobreposição com F-actina* *D= intensa marcação com sobreposição com F-actina*
Migração	*Redução de 63% em D* *Direcionalidade não mudou* *Distância relativa não mudou*
β1	*Há uma diminuição em D*
OMTC	*Há uma diminuição em D*

Efeitos do CG sobre células CTR e DIAB

3.

Controle

Células Controles Colágeno Normal (CN) X Colágeno Glicado (CG)	Efeitos do CG sobre células CTR
Proliferação	*Não há diferença*
Adesão/espraiamento (1 h)	*Há redução da área e diferença na morfologia*
Protrusões	*CN= única* *CG= única*
Área e F-actina (24 h)	*Não há diferença de morfologia e área*
α-SMA	*CN= marcação mais uniforme e pouca sobreposição com F-actina* *CG= marcação difusa e sobreposição em poucos locais com F-actina*
Migração	*Redução de 63% em CG* *Direcionalidade não mudou* *Distância relativa diminui 65% em CG*
β1	*Não altera*
OMTC	*Não há diferença*

4.

Diabetes + Glicação do colágeno tipo I

Células Diabéticas Colágeno Normal (CN) X Colágeno Glicado (CG)	Efeitos do DM + CG
Proliferação	*Não há diferença*
Adesão/espraiamento (1 h)	*Há redução da área e diferença na morfologia*
Protrusões	*CN= múltipla* *CG= menor e múltipla*
Área e F-actina (24 h)	*Não há diferença de morfologia e área*
α-SMA	*CN= marcação bem evidente com sobreposição com F-actina* *CG= marcação bem evidente com sobreposição com F-actina*
Migração	*Redução de 44% em CG* *Direcionalidade não mudou* *Distância relativa diminui 55% em CG*
β1	*Há grande redução em CG*
OMTC	*Não há diferença*

5.

Células LOW (LG) X Células HIGH (HG)	
Adesão/espraiamento (1 h)	Não há diferença
Citoesqueleto de actina 2D (24 h)	HIGH apresentam cauda longa e menos fibras de estresse
Área (24 h)	Não há diferença
Citoesqueleto de actina (3D)	HIGH apresentam corpo celular mais arredondado e mais finos prolongamentos
Polaridade	Não há diferença, maioria polarizada
Migração	• Redução de 33% na velocidade • Aumento de 60% na direcionalidade • Distância relativa não muda • Morfologia de HIGH mais alongada e com cauda longa ao longo da migração em time-lapse
MIIA	• Não mudou a imunolocalização • Não alterou a expressão
MIIB	• Mais localizada nos lamelipódios em HIGH • Não mudou a expressão
MRLC	Não mudou a imunolocalização
pMLC	Diminui a fosforilação em HIGH
TFM	Diminui a força de tração em HIGH

Inibidor de ROCK (Y27632)

- LOW com cauda longa
- HIGH continua com cauda longa
- Não há diferença na velocidade de migração

Inibidor de MLCK (ML-7)

- LOW morfologia normal
- HIGH perde a cauda longa, adquire morfologia semelhante LOW
- Velocidade de migração aumenta

Inibidor de ROCK e MLCK (Y27632 + ML-7)

- LOW morfologia com cauda longa
- HIGH continua com cauda longa
- Velocidade de migração diminui