DOUGLAS AMARAL DOS SANTOS

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

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos

Co-Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Ortis

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

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

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

1.2 Disfunções celulares causadas pela hiperglicemia

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

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

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

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

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

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

1.3 Glicose elevada e estresse do RE

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

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

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

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

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

1.4 Regulação do retículo endoplasmático pela UPR

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

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

SCHRODER; KAUFMAN, 2005; RON; WALTER, 2007). Esta via é ativada por sensores moleculares transmembranares presentes na membrana do RE, sensíveis ao acúmulo de proteínas mal enoveladas: “*Activating Transcription Fator*” 6 (ATF6), “*Inositol Requiring Kinase*” 1 (IRE1) e “*PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase*” (PERK). Estas três proteínas permanecem inativas quando ligadas à chaperona BiP/GRP78; esta chaperona também se liga a proteínas ainda não enoveladas, prevenindo sua agregação, e auxilia no enovelamento (CHAMBERS; MARCINIAK, 2014). A elevação da quantidade de proteínas mal enoveladas reduz a disponibilidade de BiP para ligar-se aos sensores, permitindo assim sua ativação. Nesse caso há a dimerização e auto-fosforilação de IRE1 e PERK, que participarão de vias de sinalização que induzirão a expressão gênica de proteínas importantes para regularização da homeostase do RE, induzindo aumento da expressão de chaperonas do RE, proteínas envolvidas na degradação de excesso de proteínas mal formadas (ERAD) e proteínas envolvidas na produção de lipídios para formação de membranas citoplasmáticas, entre outros (RON; WALTER, 2007). Por outro lado, a ativação de PERK leva a uma redução, via fosforilação de eIF2 α , da tradução de proteínas no geral, para diminuir seu acúmulo no RE (BACK; KAUFMAN, 2012). O desligamento de ATF6 de BiP faz com que essa proteína seja translocada para o aparelho de Golgi, onde é clivada, levando à sua ativação como um fator de transcrição, que irá regular a expressão gênica de diversas proteínas envolvidas na regulação da homeostase do RE (BOOT-HANDFORD; BRIGGS, 2010).

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

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

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

1.5 Efeitos do Diabetes Mellitus na função de fibroblastos

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

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

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

ALMEIDA et al., em preparação.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CARDOZO, A. K. et al. Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca^{2+} ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca^{2+} , leading to induction

of endoplasmic reticulum stress in pancreatic β -Cells. **American diabetes association**, v. 134, n. 3, p. 306–316, jun 2012

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MONTEIRO, K. S. efeitos da elevada concentração de glicose sobre a reciclagem de integrinas contendo a subunidade $\beta 1$ em fibroblastos. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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