CIBELE CRASTEQUINI GOMES

**EFEITOS DA ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE
SOBRE A EXPRESSÃO DE MIR-31 EM FIBROBLASTOS**

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos

Versão original

São Paulo

2015

RESUMO

GOMES, C. C. **Efeitos da elevada concentração de glicose sobre a expressão de miR-31 em fibroblastos.** 2015. 53 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A migração reduzida de fibroblastos dérmicos é observada em indivíduos que sofrem de Diabetes Mellitus (DM), uma doença caracterizada pela hiperglicemia crônica. Demonstramos previamente que células expostas à glicose elevada (HG) apresentam velocidade reduzida, maior número de protrusões celulares simultâneas e não produtivas (retráteis) e direcionalidade reduzida. MicroRNAs são reguladores pós-transcricionais da expressão gênica, promovendo a degradação de mRNAs alvo, ou bloqueando sua tradução. Alguns miRNAs podem afetar a migração celular, como o miR-31. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da HG sobre a expressão de miR-31 em fibroblastos dérmicos obtidos de ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos (30 dias após indução do DM com estreptozotocina) e em linhagem de fibroblastos NIH-3T3, cultivadas em baixa concentração de glicose (5 mM) ou HG (25 mM) durante 3 dias. O papel de espécies reativas de oxigênio (EROs) na expressão de miR-31 foi avaliado com a adição do antioxidante N-acetil cisteína (NAC) ao meio. A expressão de miR-31 foi estudada por RT-PCR em tempo real e o comportamento migratório foi avaliado por time-lapse. A expressão de miR-31 aumentou cerca de 3 vezes em fibroblastos obtidos de animais hiperglicêmicos, quando comparados com fibroblastos de animais normoglicêmicos. Em NIH-3T3, HG aumentou a expressão de miR-31 em 50% após 3 dias de exposição. Nestas células, o tratamento com NAC preveniu o aumento do miR-31, mantendo-o em níveis normais, e evitando o aumento no número de protrusões não efetivas. A expressão exógena de miR-31 em NIH-3T3 aumentou o número de protrusões celulares improdutivas e simultâneas e reduziu a direcionalidade das células, sem afetar a velocidade celular. Conclusão: HG aumenta a expressão de miR-31 de maneira dependente de EROs em fibroblastos. A expressão aumentada

de miR-31 pode estar envolvida na migração deficiente destas células, observada no DM.

Palavras-chave: Hiperglicemia. Migração Celular. MicroRNAs. MiR-31. Diabetes Mellitus.

ABSTRACT

GOMES, C. C. **Effects of a high glucose concentration on miR-31 expression in fibroblasts.** 2015. 53 p. *Masters thesis (Cell and Tissue Biology)*. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Impaired migration of dermal fibroblasts is observed in individuals suffering from Diabetes Mellitus (DM), a disease characterized by chronic hyperglycemia. We demonstrated previously that cells exposed to high glucose (HG) show reduced speed, increased number of simultaneous and non-productive (retractile) cellular protrusions and reduced directionality. MicroRNAs are post-transcriptional regulators of gene expression, promoting the degradation of target mRNAs or blocking their translation. Some microRNAs affect cell migration, such as miR-31. The aim of this study was to evaluate the effects of HG on the expression of miR-31 in dermal fibroblasts obtained from normoglycemic and hyperglycemic rats (30 days after induction of diabetes with streptozotocin) and NIH-3T3 fibroblasts, grown under low glucose concentration (5mM) or HG (25 mM) for 3 days. The role of reactive oxygen species (ROS) in miR-31 expression was assessed by the addition of the antioxidant N-acetyl cysteine (NAC) to the medium. The expression of miR-31 was studied by real time RT-PCR and the migratory behavior was assessed by time-lapse. The expression of miR-31 increased about 3-fold in fibroblasts obtained from hyperglycemic animals when compared to the fibroblasts from normoglycemic animals. In NIH-3T3, HG increased the expression of miR-31 by 50% after 3 days of exposure. In these cells, NAC treatment prevented the increase of miR-31 as well as the increase in the number of unproductive protrusions. Exogenous expression of miR-31 in NIH-3T3 increased the number of simultaneous cellular protrusions and reduced cell directionality, without effects on cellular speed. Conclusion: HG increases the expression of miR-31 in a ROS-dependent manner in fibroblasts. The increased expression of miR-31 may be involved in the impaired migration of these cells observed in DM.

Keywords: Hyperglycemia. Cell migration. MicroRNA. MiR-31. Diabetes Mellitus.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de distúrbios metabólicos que, independente da sua etiologia, apresenta como característica a hiperglicemia. É considerada uma das doenças mais importantes no mundo, afetando cerca de 347 milhões de pessoas. No Brasil, cerca de 8,7% da população tem diabetes (International Diabetes Federation, 2014). Além do impacto na qualidade de vida do paciente e de seus familiares, o diabetes também gera altos custos para o sistema público de saúde, por sua natureza crônica e suas complicações. As complicações comuns do Diabetes Mellitus incluem a retinopatia e o edema macular diabético; a neuropatia diabética, que pode levar ao acidente vascular cerebral; arteriosclerose e doença vascular periférica, insuficiência renal e a deficiência na cicatrização de feridas, que contribui para a ocorrência de feridas crônicas (American Diabetes Association, 2010).

1.2 Captação e metabolismo da glicose e estresse oxidativo

A glicose ($C_6H_{12}O_6$) é uma das principais fontes de energia utilizada pelos organismos eucariontes. O metabolismo deste monossacarídeo através do processo de respiração celular libera energia química que, por sua vez, é armazenada durante a síntese de moléculas de adenosina trifosfato (ATP). Estas moléculas são então, utilizadas pela célula em suas múltiplas funções que requerem gasto de energia.

Um dos mecanismos de transporte de glicose se dá através de proteínas carreadores associados à membrana - transportadores de glicose GLUT. Os transportadores de glicose são específicos para o enantiômero D-glicose, e seu transporte não requer gasto de energia pela célula. A ligação da glicose ao transportador GLUT na membrana celular promove uma alteração conformacional do transportador, levando a entrada de glicose no meio intracelular. As isoformas dos transportadores GLUT variam de acordo com o tecido em que se encontram, assim como sua especificidade ao substrato (hexoses), cinética de transporte, e tem sua expressão regulada em diferentes condições fisiológicas e patológicas (GOULD; HOLMAN, 1993; MUECKLER et

al., 1985).

A glicose no meio intracelular é então fosforilada pela enzima hexoquinase, gerando glicose-6-fosfato. No citoplasma da célula ocorre a glicólise, uma cadeia de dez reações onde a glicose é oxidada gerando duas moléculas de piruvato, além de duas moléculas de ATP e NADH^+ , que serão introduzidos na cadeia respiratória ou na fermentação. Em aerobiose, o piruvato entra na mitocôndria, e por ação da piruvato desidrogenase, é convertido em acetil coenzima A (acetil-coA), e na matriz mitocondrial é oxidado no ciclo de Krebs, produzindo CO_2 , H_2O , NADH E FADH_2 . Estes últimos são doadores de elétrons, e serão responsáveis por gerar um fluxo de elétrons dentro da cadeia transportadora mitocondrial, na membrana interna desta organela.

A cadeia transportadora de elétrons é formada por cinco complexos proteicos ligados à membrana interna das cristas mitocondriais. Esta série de complexos é responsável por transportar elétrons através de reações de óxido-redução. A passagem de elétrons através dos complexos da cadeia faz com que seja gerado um gradiente eletroquímico, onde íons H^+ são transportados para fora da matriz mitocondrial. A energia gerada dessa forma é utilizada pela enzima ATP sintase que, através do transporte de prótons a favor do seu gradiente eletroquímico para dentro da matriz mitocondrial, converte trabalho mecânico em energia química usada na síntese do ATP.

As células que não são susceptíveis ao dano causado pela hiperglicemia mostram uma relação inversa entre a quantidade de glicose extracelular e o seu transporte. Por outro lado, alguns tipos celulares, como por exemplo as células endoteliais, mostram um aumento no transporte de glicose quando sua concentração está elevada, fazendo com que a concentração intracelular aumente. A maior quantidade de glicose no ciclo de Krebs faz com que aumente o fluxo na cadeia transportadora de elétrons e um limiar máximo do gradiente eletroquímico é atingido, fazendo com que a transferência de elétrons seja bloqueada no interior do complexo III e o O_2 seja reduzido à superóxido, altamente reativo (TURRENS, 2003).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) é um termo utilizado para identificar moléculas e radicais livres derivadas do oxigênio molecular. O ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) é produzido na redução de oxigênio por um elétron, é precursor da maioria dos EROs. A dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ através da superóxido dismutase produz H_2O_2 ,

que pode ser reduzido totalmente a H_2O ou parcialmente ao radical hidroxil ($OH\bullet$), um potente oxidante. O $O_2^{\bullet-}$ pode ainda reagir com outros radicais, como o óxido nítrico ($NO\bullet$), produzindo peroxinitrito, outro potente oxidante. Os agentes oxidantes derivados do $NO\bullet$ são chamados de espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Estas espécies reativas de oxigênio (EROs) podem reagir com moléculas importantes dentro do citoplasma da célula, sendo capazes de danificar proteínas, lipídeos e DNA (TURRENS, 2003).

No DM, a maior formação de íons superóxido pode levar à ativação das cinco maiores vias que regulam a patogênese das complicações nesta doença: O aumento no fluxo da via dos polióis, ativação de isoformas da proteína cinase C, o aumento no fluxo na via das hexosaminas, a formação de produtos finais de glicação avançada (*Advanced Glycation End Products* - AGEs) e também na expressão de seus receptores nas células (RAGEs) (BROWNLEE, 2001).

A glicação de proteínas altera sua estrutura e função, e a ligação de AGEs com seus receptores (RAGEs) pode levar a modificações na sinalização celular e à produção de mais radicais livres. Entre outros efeitos, o aumento do fluxo dessas vias alternativas à glicólise pode aumentar o estresse oxidativo através do desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a diminuição nas defesas antioxidantes da célula.

A defesa antioxidante intracelular é suprida por enzimas antioxidantes. Três principais enzimas catalisam a decomposição de espécies reativas de oxigênio: a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (Gpx) e a catalase (CAT), que diferem entre si quanto a estrutura, distribuição em diferentes tecidos e cofatores requeridos para o seu funcionamento. SOD é uma metaloproteína que catalisa a conversão do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio. Gpx é uma enzima que tem como substrato a glutathiona reduzida (GSH) que é oxidada a glutathiona oxidada (GSSH). Gpx usa o GSH como um doador específico de hidrogênio para a redução de substratos não específicos (peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos lipídicos e não lipídicos). A catalase é uma enzima encontrada em peroxissomos em eucariotos, que degrada peróxido de hidrogênio produzindo água e oxigênio. Antioxidantes não-enzimáticos incluem vitaminas A, C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), glutathiona, ácido α -lipoico, carotenóides e outros. Além destas, muitas outras enzimas também estão envolvidas na prevenção do dano oxidativo ou seu reparo. A

regulação da atividade enzimática antioxidante em organismos eucariotos pode ser influenciada por uma série de condições fisiológicas e patológicas (RAHIMI et al., 2005).

As alterações metabólicas que acompanham o diabetes podem afetar o balanço pró-oxidante – antioxidante de diversas formas. Como dito anteriormente, a hiperglicemia potencializa a ligação não enzimática de glicose a proteínas, a glicação, que causa mudanças estruturais e funcionais em proteínas. Assim, a alta glicose intra e extracelular pode causar glicação e consequentemente mudanças funcionais em enzimas antioxidantes. O diabetes também pode afetar a atividade destas enzimas através de alterações na disponibilidade de micronutrientes, que servem como cofatores para a atividade enzimática antioxidante (SZALECZKY et al., 1999). As deficiências antioxidantes mais comuns encontradas no DM são os baixos níveis de ascorbato, glutathione e superóxido dismutase (GIACCO; BROWNLEE, 2010; RAHIMI et al., 2005).

Numerosos estudos têm mostrado que o uso de antioxidantes no tratamento do DM é eficaz em prevenir ou tratar as complicações desta doença.

1.3 N –acetil-cisteína

A N-acetil-cisteína (NAC - $C_5H_9NO_3S$) é um derivado da L-cisteína, e precursora na formação do antioxidante glutathione. O grupo tiol em sua estrutura confere os efeitos antioxidantes, sendo capaz de reduzir radicais livres. O NAC pode inativar EROs, aumentar os níveis de glutathione, sofrer auto-oxidação (e produzir H_2O_2) e servir como agente redutor (PUBCHEM, 2015).

Aktunc et al., (2010) investigaram o efeito do uso de NAC na fase proliferativa do processo cicatricial de feridas em camundongos com DM induzido por aloxano. A administração de NAC nas feridas mostrou efeitos benéficos na cicatrização tanto em animais controle como diabéticos, resultando em redução de EROs e aumento de GSH no tecido cicatricial. Portanto, uso de antioxidantes no tratamento de feridas crônicas no DM é um método que tem se mostrado eficaz em diferentes modelos experimentais.

1.4 Fibroblastos e o processo cicatricial

As alterações metabólicas características do DM levam a uma série de complicações, como a cicatrização deficiente de feridas, resultando em feridas crônicas. A cicatrização cutânea é um processo fisiológico que ocorre em resposta a uma injúria ao tecido, e que ocorre através de eventos celulares que visam restabelecer a integridade tecidual. A cicatrização de feridas cutâneas ocorre seguindo 3 passos principais: inflamação, neoformação tecidual, e remodelação (SINGER; CLARK, 1999).

Quando a pele sofre uma injúria, os constituintes do sangue são extravasados de vasos sanguíneos lesados, e formam o coágulo sanguíneo. As plaquetas produzem vários fatores quimiotáticos, como o *Transforming Growth Factor Beta1* (TGF- β 1), que por sua vez recruta rapidamente leucócitos para o local da injúria, iniciando a fase inflamatória. Esses leucócitos secretam quimiocinas e citocinas inflamatórias para aumentar a resposta inflamatória que normalmente atinge o pico após poucos dias da lesão. À medida que a fase inflamatória desaparece, começa a fase de formação tecidual. Esta fase envolve a formação de tecido de granulação e a reepitelização. A formação do tecido de granulação ocorre em torno de 48 horas, e é caracterizada pelo início da angiogênese e recrutamento dos fibroblastos através de citocinas dos macrófagos. Sobre o local lesado, queratinócitos da margem da lesão adquirem motilidade para migrar e cobrir a ferida. Uma série de eventos biológicos tem lugar para promover a formação do tecido de granulação, incluindo a ativação de fibroblastos e a degradação e produção de matriz extracelular, diferenciação em miofibroblastos e a neovascularização do tecido.

Durante a fase tardia da cicatrização, quando ocorre a remodelação da matriz extracelular (MEC), os fibroblastos proliferam, migram e secretam fatores de crescimento. Os fibroblastos e células inflamatórias remanescentes secretam metaloproteinases de matriz (MMPs), e ocorre a alteração da síntese de colágeno tipo III para colágeno tipo I. A síntese de colágeno cessa no tecido fibrótico, e ocorre a formação de uma cicatriz no local de injúria I (GURTNER et al., 2008).

Conforme descrito acima, o fibroblasto é essencial processo cicatricial. Ele tem um papel central na deposição e remodelamento de matriz, e também como célula sinalizadora, secretando fatores de crescimento durante o processo de reparo, e o impedimento destas funções pode contribuir para a formação de feridas crônicas.

Muitas funções celulares dos fibroblastos estão alteradas nos diabéticos. Lerman et al. mostraram anteriormente que fibroblastos de camundongos diabéticos migram 75% menos que aqueles de camundongos normoglicêmicos, e mostram uma resposta deficiente à hipóxia, uma condição comum em feridas crônicas. Porém, os mecanismos envolvidos neste efeito ainda não são completamente entendidos.

1.5 Migração celular e hiperglicemia

A migração celular é um processo cíclico, regulado por sinais extracelulares, que ativam vias de sinalização reguladoras do citoesqueleto de actina e microtúbulos (HORWITZ; WEEB, 2003). Devido à polimerização da actina, a célula estende uma protrusão na direção do movimento, chamada de lamelipódio, que é estabilizada pela formação de adesões ao substrato. Algumas adesões maduras se tornam locais de ancoragem para o citoesqueleto de actina, e a célula traciona seu corpo para a frente, através da miosina II (fibras de estresse), que auxiliam no movimento do corpo celular na direção determinada. Há então a liberação das adesões e a contração da parte posterior da célula.

A família de pequenas GTPases Rho (de *Ras-Homology*) regulam cada passo deste ciclo (RIDLEY et al., 2003). Estas proteínas ciclaram entre um estado ativo (ligado a GTP) e um inativo (ligado a GDP). Quando ativas, as GTPases Rho interagem com numerosas proteínas efetoras para exercer suas funções. Este ciclo é regulado por GEFs (*Guanine Nucleotide Exchange Factors*) que catalisam a troca de nucleotídeos levando à sua ativação; GAPs (*Gtpase Activating Proteins*) que auxiliam na hidrólise do GTP, levando à inativação; e GDIs (*Guanine Nucleotide Exchange Inhibitors*) que removem GTPases inativas das membranas.

As GTPases RhoA e Rac1 são ubiquamente expressas e bem conhecidas por seu papel na regulação da migração: Rac1 regula a formação de lamelipódios e a dinâmica da formação de novas adesões, enquanto RhoA está envolvida na formação de feixes de actina contráteis e maturação de adesões. O balanço entre Rac1 e RhoA determinaria o comportamento migratório

(ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002; HANNA; EL-SIBAI, 2013).

Nós mostramos que o estresse oxidativo promovido pela alta concentração de glicose (HG) afeta negativamente a migração e a maturação das adesões em diferentes tipos celulares, incluindo fibroblastos. Devido à ativação de Rac1, as células perdem sua polaridade, e muitos lamelipódios são formados simultaneamente em diferentes direções. A maturação das adesões, no entanto, é prejudicada, e os lamelipódios retraem, tornando-se protrusões celulares não produtivas (LAMERS et al., 2011).

Há uma complexa regulação da atividade das RhoGTPases, como interações proteína-proteína, proteína-lipídeos, ligação a segundos mensageiros (DAG) e modificações pós transcricionais, além de microRNAs, descritos mais recentemente (CHERFILS; ZEGHOUF, 2013; LIU et al., 2012).

1.6 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são reguladores negativos da expressão gênica. Eles são uma classe de pequenos RNAs endógenos não-codificantes (~22 nucleotídeos), conservados evolutivamente, que interagem com mRNAs alvo, levando à degradação ou repressão da tradução. Os miRNAs são transcritos inicialmente no núcleo a partir de regiões intragênicas ou intergênicas do DNA, pela RNA polimerase II, formando miRNAs primários longos. Esses pri-miRNAs são clivados no núcleo pela enzima RNase III Drosha em estruturas de aproximadamente 70-100 nucleotídeos em formato de “loop”, são os chamados pre-miRNAs. Os pre-miRNAs são transportados do núcleo para o citoplasma através da exportina 5, e são novamente clivados por outra enzima RNase III, a Dicer, em estruturas dupla fita de 18-24 oligonucleotídeos, formando uma estrutura dupla miRNA:miRNA* (ou extremidades 3p e 5p). Depois da separação destas fitas, uma das duas se tornará um miRNA maduro, que será incorporado ao RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), enquanto a outra fita pode ser degradada, ou ter um papel funcional na regulação da homeostasia de miRNAs, assim como ter um papel regulatório *downstream*. O complexo RISC funciona através do pareamento perfeito ou imperfeito com uma sequência complementar em um RNA mensageiro alvo, e induz a degradação do mRNA alvo, ou a inibição da sua tradução. A maioria dos miRNAs de animais pareiam imperfeitamente

com seus alvos, levando à inibição da tradução. Este mecanismo leva à redução do nível proteico do alvo do miRNA, e tem profundas consequências na homeostasia celular. Um único gene pode ser regulado por múltiplos miRNAs, assim como um único miRNA pode ter mais que um alvo, devido ao seu pareamento imperfeito com o mRNA alvo. Os miRNAs estão envolvidos na regulação de importantes processos biológicos, como o desenvolvimento, diferenciação celular, apoptose e movimento celular. Assim, os níveis de expressão de miRNAs são importantes em processos fisiológicos, e quando alterados, podem ser associados a uma série de patologias (DONG et al., 2013).

Portanto, o estudo dos miRNAs é importante para o entendimento tanto de processos fisiológicos quanto de doenças como o câncer, desordens genéticas e desordens metabólicas. Além disso, os níveis de expressão de diferentes miRNAs podem servir como biomarcadores para determinadas doenças e seus estágios, servindo também como um alvo potencial para novas drogas, ou podem também ser usados na terapia gênica em desordens genéticas. A variedade de alvos de um único miRNA pode levar a uma regulação combinatória de miRNAs, que individualmente regulam a expressão de diferentes proteínas de uma única via de sinalização em particular. O funcionamento dos miRNAs é um modo complexo da rede de regulação da expressão gênica.

1.7 MicroRNAs e Diabetes Mellitus

MiRNAs estão envolvidos na gênese do DM, e tem importantes funções nas complicações a longo prazo desta doença. Tanto Diabetes tipo I quanto do tipo II estão associados com alterações nos níveis de muitos miRNAs.

O miR-375 por exemplo é um dos mais abundantes miRNAs presentes nas células das ilhotas pancreáticas. A inibição do miR-375 em zebrafish resulta em defeitos no desenvolvimento de ilhotas pancreáticas. Em células beta maduras, o miR-375 exerce uma regulação negativa na secreção de insulina induzida pela glicose. Nas fases iniciais do diabetes tipo I, as ilhotas pancreáticas são infiltradas por células imunes, e as células beta ficam expostas a mediadores pró-inflamatórios. A exposição crônica à essas citocinas tem um impacto nas funções das células beta, levando a redução do conteúdo de insulina, defeitos

na sua secreção, e aumento da apoptose. O perfil global de miRNAs de uma linhagem celular secretora de insulina, tratada com citocinas pró-inflamatórias revelou uma forte indução do miR-21, miR-34a, e miR-146 (GUAY et al., 2010).

O diabetes também causa mudança nos níveis de miRNAs detectáveis no sangue e outros fluidos corporais. Por isso muitos estudos têm foco em buscar miRNAs que sirvam como biomarcadores, como uma forma de detectar precocemente e prevenir o diabetes e suas complicações.

Sebastiani et al., (2013) analisaram o perfil de miRNAs em amostras de plasma sanguíneo de pacientes com diabetes tipo II, que apresentavam ou não complicações vasculares, em busca de um potencial biomarcador para estas complicações. Entre os miRNAs que se apresentaram alterados no grupo de pacientes com complicações microvasculares o miR-31 destacou-se por sua expressão elevada, podendo estar relacionado com a microangiopatia.

MiRNAs estão se tornando elementos importantes no estudo da cicatrização. O processo de cicatrização normal envolve mudanças na expressão de miRNAs específicos, em fases específicas do processo cicatricial, e uma regulação aberrante desses miRNAs podem ter um papel chave no estabelecimento de feridas crônicas (BANERJEE et al., 2010).

A análise de um PCR *array* de tecidos cicatriciais depois de 8 dias de cicatrização mostrou o padrão de expressão de 14 genes, que tem expressão aumentada na pele de camundongos diabéticos, variando significativamente em comparação com feridas normais. MiR-146-b, miR-21, miR-141 e miR-142 apresentaram um aumento de 20 vezes entre feridas normais e de diabéticos durante a cicatrização. Outros genes como miR-126, miR-22, miR-138, miR-1, miR-196a, miR-215, miR-24, let-7i e miR-101b exibiram 20 vezes nos seus níveis de expressão. Além disso, ainda há alguns miRNAs cujas expressões basais na pele de diabéticos estavam similares aos níveis na pele normal, mas suas expressões durante a cicatrização foram diferentes. Estes miRNAs incluem miR-20b, miR-10a, miR-10b, miR-96, miR-128, miR-452 e miR-541. A maioria desses miRNAs já foram mostrados como envolvidos em processos celulares que influenciam na cicatrização, como proliferação, migração, angiogênese e regeneração tecidual (MADHYASTHA et al., 2011).

É conhecido que muitos miRNAs são induzidos pelo estresse oxidativo em diferentes tipos celulares. Porém, pouco se sabe sobre esta forma de

regulação dos miRNAs (CHEN et al., 2013; SIMONE et al., 2009).

Simone et al., (2009) utilizaram fibroblastos normais humanos para avaliar a expressão de miRNAs frente a diferentes agentes oxidantes (peróxido de hidrogênio, etoposídeo e radiação). Este experimento demonstrou um padrão comum de expressão de miRNAs em resposta a esses agentes. Além disso, o pré-tratamento destas células com NAC preveniu as alterações na expressão de miRNAs, sugerindo que estes miRNAs são responsivos ao estresse oxidativo. Neste estudo o miR-31 aparece elevado em resposta ao etoposídeo, um agente quimioterápico causador de estresse oxidativo.

1.8 MicroRNAs e migração celular

A migração celular pode ser regulada por miRNAs que tem como alvo diferentes proteínas reguladoras da família das pequenas GTPases Rho (GTPases Rho, GEFs e GAPs), assim como integrinas (CHEN et al., 2013; LIU et al., 2012; VALASTYAN et al., 2011). Assim, uma condição patológica que altere a expressão de miRNAs específicos pode alterar o funcionamento desta via de sinalização, e consequentemente a regulação do citoesqueleto.

Em modelos de estudo de câncer, o miR-31 tem sido mostrado como um regulador de muitas moléculas associadas à migração celular. RhoA é um alvo de miR-31 em glioblastoma e câncer de mama, onde a diminuição na sua expressão faz com que aumente a capacidade metastática desses tipos de tumores. Outro alvo na via de controle da migração celular é a radixina. A radixina é uma proteína que participa na formação do complexo ERM (ezrina, radixina e moesina) e funciona como uma proteína adaptadora ligando o citoesqueleto a membrana plasmática em estruturas ricas em actina, sendo essencial para a organização do esqueleto cortical. Em câncer de mama, o miR-31 regula também a expressão de radixina e de integrina $\alpha 5$ (VALASTYAN et al., 2010).

Augoff et al. (2011), mostraram que em câncer de mama o miR-31 é capaz de regular diversas subunidades de integrinas, como $\alpha 5$, $\alpha 2$, αv e $\beta 3$. Além disso, o miR-31 é capaz de reduzir indiretamente a expressão de integrina $\beta 1$ na membrana celular, através da redução da subunidade α com a qual formam dímeros.

Sossey – Alaoui et al. (2010), também em câncer de mama, mostraram que o miR-31 tem como alvo Wave3, outra proteína que tem função na migração celular. Wave3 é importante para a ativação do complexo Arp2/3 e consequentemente para a dinâmica do citoesqueleto de actina.

Neste estudo pretendemos avaliar o efeito do estresse oxidativo causado pela glicose elevada sobre a expressão do miR-31, e sua possível relação com a capacidade migratória de fibroblastos.

6 CONCLUSÃO

Em resumo, este estudo mostra que a alta concentração de glicose aumenta a expressão de miR-31 de maneira dependente da geração de EROs em fibroblastos. A superexpressão do miR-31 pode estar envolvida na deficiência na migração causada pela hiperglicemia, potencialmente regulando diferentes proteínas relacionadas a adesão celular e migração.

REFERÊNCIAS*

AKTUNC, E.; OZACMAK, V.H.; OZACMAK, H.S.; F. BARUT, F.; BUYUKATES, M.; KANDEMIR, O.; DEMIRCAN, N. N-acetyl cysteine promotes angiogenesis and clearance of free oxygen radicals, thus improving wound healing in an alloxan-induced diabetic mouse model of incisional wound. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 35, n. 8, p. 902-909, 2010.

ALMEIDA, M.E.S. **Hiperglicemia e interação fibroblasto-matriz extracelular – influências na adesão e migração em substratos bidimensional e tridimensional**. Dissertação de mestrado (Biologia Celular e Tecidual). Programa de Biologia Celular e Tecidual, Instituto de Ciências Biomédicas da USP. 2011.

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v.33, suplemento S62–S69, 2010.

AUGOFF, K.; MCCUE, B.; PLOW, E.F.; SOSSEY-ALAOUI, K. miR-31 and its host gene lncRNA LOC554202 are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer. **Mol. Cancer**., v.5, n. 11, 2012.

AUGOFF, K.; DAS, M.; BIALKOWSKA, K.; MCCUE, B.; PLOW, E.F.; SOSSEY-ALAOUI, K. miR-31 Is a Broad Regulator of β 1-Integrin Expression and Function in Cancer Cells. **Mol. Cancer Res.**, v.9, n.11, p. 1500-1508, 2011.

BANERJEE, J.; CHAN, Y. C.; SEN C.K. MicroRNAs in skin and wound healing. **Physiol. Genomics**, v.10, n.43, p.543-556, 2011.

BOTCHKAREVA, N.V. MicroRNA/mRNA regulatory networks in the control of skin development and regeneration. **Cell Cycle**, v.11, v.3, p.468-474, 2012.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p.813-820, 2001.

CHEN, W.; HARBECK, M.C.; ZHANG, W.; JACOBSON, J.R. MicroRNA regulation of integrins. **Transl. Res.**, v.162, n.3, p.133-143. 2013.

CHEN, Z.; SHENTU, T.P.; WEN, L.; JOHNSON, D.A.; SHYY, J.Y.J. Regulation

---

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

of SIRT1 by Oxidative Stress-Responsive miRNAs and a Systematic Approach to Identify Its Role in the Endothelium. **Antioxid. Redox. Signal.**, v.19, n.13, p.1522–1538. 2013.

CHERFELS, J.; ZEGHOUEF, M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, AND GDIs. **Physiol. Rev.**, v. 93, n.1, p. 269-309, 2013.

CLAY, K.A.; LUAN, L.; LOOMANS, H.; ANDL, C.D.; ANDL, T. MiR-31 regulates a gene network involved in keratinocyte activation, migration and differentiation. 2014 Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. **Journal of Investigative Dermat.**, v.134, suplemento p.S132–S138, 2014.

DIANA-TarBase v7.0. Disponível em: <<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index&mirnas=MIMAT0000538>>. Acesso em: 13 mar. 2015.

DONG, H.; LEI J.; DING, L.; WEN, Y.; JU, H., ZHANG, X. MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis. **Chem. Rev.**, v.113, n.8, p.6207-33, 2013.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature.**, v.420, p.629-635, 2002.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Circ. Res.**, v.107, n.9, p.1058-70, 2010.

GOULD, G.W.; HOLMAN, G.D. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. **Biochem. J.**, v.295, p.329–341, 1993.

GUAY, C.; ROGGLI, E.; NESCA, V.; JACOVETTI, C.; REGAZZI, R. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? **Transl. Res.**, v.157, n.4, p.253-264, 2011.

GURTNER, G.C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M.T. Wound repair and regeneration. **Nature.**, v.453, p.314-21, 2008.

HANNA, S.; EL-SIBAI, M. Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. **Cell. Signal.**, v.25, p.1955–1961, 2013.

HORWITZ, A.R.; WEEB, D. Cell migration. **Cell Press**. v.13, n.19, p.756-9, 2003.

HUNG, P.S.; TU, H.F.; KAO, S.Y.; YANG, C.C.; LIU, C.J.; HUANG, T.Y.; CHANG, K.W.; LIN, S.C. miR-31 is upregulated in oral premalignant epithelium and contributes to the immortalization of normal oral keratinocytes. **Carcinogenesis**. v.35, n.5, p.1162-1171, 2014.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. DIABETES ATLAS. 2014. Disponível em <<http://www.idf.org/diabetesatlas>>. Acesso em: 09 jun. 2015.

JIANG, L.; LIU, X.; KOLOKYTHAS, A.; YU, J.; WANG, A.; HEIDBREDER, C.E.; SHI, F.; ZHOU, X. Downregulation of the Rho GTPase signaling pathway is involved in the microRNA-138-mediated inhibition of cell migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma. **Int. J. Cancer.**, v.127, p.505–512, 2010.

KOVACS, B.; LUMAYAG, S.; COWAN, C.; XU, S. microRNAs in Early Diabetic Retinopathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Invest. Ophthalm. & Visual Sci.**, v.52, n. 7, p. 4402-4409, 2011.

LAMERS, M.L.; ALMEIDA, M.E.S.; VICENTE-MANZANARES, M.; HORWITZ, A.F.; SANTOS, M.F. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. **PLoS ONE.** v.6, n.8, e22865, 2011.

LERMAN, O.Z.; GALIANO, R.D.; ARMOUR, M.; LEVINE, J.P.; GURTNER, G.C. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. **Am. J. of Pathol.**, v.162, n.1, p.303–312, 2003.

LI, D.; LI, X.; WANG, A.; MEISGEN, F.; PIVARCSI, A.; SONKOLY, E.; STAHL, M.; LANDÉN, N. X. MicroRNA-31 Promotes Skin Wound Healing by Enhancing Keratinocyte Proliferation and Migration. **J. Invest. Dermatol.**, v.135, n.6, p.1676-1685, 2015.

LIU, H.; CAO, YOU-DE.; YE, WEI-XIA.; SUN, YANG-YANG. Effect of microRNA-206 on cytoskeleton remodelling by downregulating Cdc42 in MDA-MB-231 cells. **Tumori.**, v.96, p.751-755, 2010.

LIU, M. BI, F.; ZHOU, X.; ZHENG Y. Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. **Trends Cell Biol.** v.22, n.7, p.365-373, 2012.

MADHYASTHA, R., MADHYASTHA, H.; NAKAJIMA, Y.; OMURA, S.; MARUYAMA, M. MicroRNA signature in diabetic wound healing: promotive role of miR-21 in fibroblast migration. **Intern. W. J.**, v.9, n.4, p.355–361, 2012.

microRNA.org – Targets and Expression. Disponível em: <<http://www.microrna.org/microrna/getMrna.do?gene=387&utr=12476&organism=9606>>. Acesso em: 13 mar. 2015.

MUECKLER, M.; CARUSO, C.; BALDWIN, S.A.; PANICO, M.; BLENCH, I.; MORRIS, H.R.; ALLARD, W.J.; LIENHARD, G.E.; LODISH, H.F. Sequence and structure of a human glucose transporter. **Science**. v.229, n.4717, p.941-945, 1985.

PicTar Web Interface. Disponível em: <http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar_vertebrate.cgi>. Acesso em: 13 mar. 2015.

PubChem Compound Database. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/581>. Acesso em: 01 jul. 2015.

RAHIMI, R.; NIKFAR, S.; LARIJANIB, B.; ABDOLLAHI, M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. **Biomed. & Pharmac.**, v.59, n.7, p.365–373, 2005.

RIDLEY, A.J.; SCHWARTZ, M.A.; BURRIDGE, K.; FIRTEL, R.A.; GINSBERG, M.H. et al. Cell migration: integrating signals from front to back. **Science**., v.302, n.5651, p.1704–9, 2003.

SEBASTIANI, G.; NIGI, L.; SPAGNUOLO, I.; MORGANTI, E.; FONDELLI, C.; DOTTA, F. MicroRNA profiling in sera of patients with type 2 diabetes mellitus reveals an upregulation of miR-31 expression in subjects with microvascular complications J. **Biomed. Sci. and Engin.**, v. 6, p.58-64, 2013.

SIMONE, N.L.; SOULE, B.P.; LY, D.; SALEH, A.D.; SAVAGE, J.E. Ionizing Radiation-Induced Oxidative Stress Alters miRNA Expression. **PLoS ONE**. v.4, n.7, e6377, 2009.

SINGER; A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous Wound Healing. **N. Engl. J. Med.**, p.738-746, 1999.

SOSSEY-ALAOUI, K.; DOWNS-KELLY, E.; DAS, M.; IZEM, L.; TUBBS, R.; PLOW, E.R. WAVE3, an actin remodeling protein, is regulated by the metastasis suppressor microRNA, miR-31, during the invasion-metastasis cascade. **Int. J. Cancer**, v.129, p.1331–1343, 2011.

SZALECZKY, E.; PRECHL, J.; FEHÉR, J.; SOMOGYI, A. Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus – a rational approach. **Postgrad Med J**. v.75, n.879, p.13-17, 1999.

Target Scan Human – Prediction of microRNA targets. Disponível em: <http://www.targetscan.org/cgi-bin/vert_61/view_gene.cgi?rs=NM_004850&taxid=9606&members=&showcnc=

[1&shownc=1#miR-31](#)>. Acesso em: 13 mar. 2015.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J. of Physiol.**, v.552, n.2, p.335–344, 2003.

VALASTYAN, S.; CHANG, A.; BENAICH, N.; REINHARDT, F.; WEINBERG, R.A. Concurrent Suppression of Integrin $\alpha 5$, Radixin, and RhoA Phenocopies the Effects of miR-31 on Metastasis. **Cancer Res.**, v.70, n.12, p.5147–5154, 2010.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R.A. Roles for microRNAs in the regulation of cell adhesion molecules. **J. Cell. Sci.**, n.24, p.999-1006, 2011.

VALDERRAMA, F.; THEVAPALA, S.; RIDLEY, A.J. Radixin regulates cell migration and cell-cell adhesion through Rac1. **J. Cell. Sci.**, v.125, p.3310-9, 2012.

XU, N.; MEISGEN F, BUTLER LM, HAN G, WANG XJ, SÖDERBERG-NAUCLÉR C, STÅHLE M, PIVARCSI A, SONKOLY E. MicroRNA-31 is overexpressed in psoriasis and modulates inflammatory cytokine and chemokine production in keratinocytes via targeting serine/threonine kinase 40. **J. Immunol.**, v.190, n.2, p.678-688, 2013.