KELLY SALZMANN MONTEIRO

**EFEITOS DA ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SOBRE A
RECICLAGEM DE INTEGRINAS CONTENDO A SUBUNIDADE $\beta 1$ EM
FIBROBLASTOS**

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

**São Paulo
2014**

KELLY SALZMANN MONTEIRO

**EFEITOS DA ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SOBRE A
RECICLAGEM DE INTEGRINAS CONTENDO A SUBUNIDADE $\beta 1$ EM
FIBROBLASTOS**

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos

Versão original

São Paulo
2014

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

Monteiro, Kelly Salzmann.

Efeitos da elevada concentração de glicose na reciclagem de integrinas contendo a subunidade $\beta 1$ em fibroblastos / Kelly Salzmann Monteiro. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Marinilce Fagundes dos Santos.

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

Versão do título para o inglês: Effects of high glucose concentration on the recycling of $\beta 1$ containing integrins in fibroblasts.

1. Glicose elevada 2. GTPases Rab 3. Endocitose 4. Fibroblasto 5. Reciclagem 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/SBIB0138/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Kelly Salzmann Monteiro.

Título da Dissertação: Efeitos da elevada concentração de glicose na reciclagem de integrinas contendo beta 1 e na secreção de fibronectina em fibroblastos NIH 3T3.

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

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **096** nas fls. **131** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Marinilce Fagundes dos Santos**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos do diabetes mellitus sobre a reciclagem de integrinas contendo fÓ1 e sobre a secreção de fibronectina em fibroblastos dermicos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Kelly Salzmman Monteiro, Maíra Estanislau Soares de Almeida, Celene Rebouças de Lima**, 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 **06.09.2012**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 13 de setembro de 2012.

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

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

Dedico este trabalho aos meus pais, Sergio e Lucia, por todo suporte e motivação e ao meu noivo, Argentino, pela paciência e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força, perseverança, por me guiar nas escolhas que fiz e prover ótimas pessoas com quem tive o prazer de conviver.

À minha orientadora, professora Marinilce Fagundes dos Santos, pela oportunidade de realizar esta grande etapa na minha formação, pela confiança, paciência e por me ensinar a ser uma pesquisadora com senso crítico e independente.

Aos meus companheiros de laboratório Ana Flávia, Carol Viviana, Caroline Xavier, Cibele Crastequini, Cilene Rebouças, Douglas Amaral, Juliana Florim, Maíra Almeida, Mariana Monteiro, Paula Sampaio e Robson Lucas Pontes e à técnica do laboratório, Gabriella Moraes, pela boa convivência, companheirismo e momentos felizes que nos renderam boas risadas.

À Maíra Almeida pelo apoio desde a minha entrada no laboratório, ensinamento de técnicas, dedicação e amizade.

À minha companheira de laboratório Juliana Florim pela amizade, que me ajudou a tornar essa jornada mais leve.

Ao meu noivo, Argentino Domiciano por seu amor, paciência, força, motivação e por ter me consolado em momentos de angústia.

À minha família: Sergio, Lucia, Michelle e Andressa, por todo apoio financeiro, incentivo e carinho.

Ao Professor Doutor Ruy Jaeger por me deixar usar seu laboratório e reagentes que foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Agradeço aos seus alunos Basílio e Livia, pela amizade e disposição em me ajudar.

À aluna Adriane Siqueira por me ajudar com a técnica de western blotting, por dividir seus reagentes, pela sua disposição em me ajudar e por sua paciência.

À Professora Doutora Dânia Emi Hamassaki, por ter me orientado e me ensinado grandes lições no curso preparatório de aperfeiçoamento ao ensino (PAE) e por ter cedido seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

À Professora Doutora Alison Colquhoun, pela doação do anticorpo anti-fibronectina e por ter cedido o uso do aparelho revelador para western blotting e seus alunos, Renata, Mathew e Fábio.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular e Tecidual: Chao Y. Irene Yan, Maria Inês Borella e Marília Seelaender, que contribuíram direta ou indiretamente para o andamento do projeto.

À secretária Regina Valbom, que me ajudou junto à Pós-Graduação.

Aos funcionários da biblioteca, que contribuíram com a revisão textual.

À todos os meus amigos que estiveram ao meu lado torcendo pelo meu sucesso.

À CAPES por todo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*
(Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

MONTEIRO, K. S. **Efeitos da elevada concentração de glicose sobre a reciclagem de integrinas contendo $\beta 1$ em fibroblastos.** 2014. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

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

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

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

ABSTRACT

MONTEIRO, K. S. **Effects of high glucose concentration on the recycling of β 1-containing integrins in fibroblasts.** 2014. 69 p. Master thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP- Adenosina-5'-trifosfato

GTP- Guanina-5'-trifosfato

AP2 – Proteína adaptadora de clatrina 2

ARF6 – Fator de ribosilação 6

DAG – Diacilglicerol

DM – Diabetes Mellitus

EEA1- *Early endosome antigen 1*

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FN – Fibronectina

GLUT – Transportador de glicose

HG – Meio com elevada concentração de D-glicose (25 mM)

LG - Meio com concentração fisiológica de D-glicose (5 mM)

MEC – Matriz extracelular

OMS – Organização Mundial da Saúde

SFB – Soro fetal bovino

SNAREs- *Soluble NSF attachment receptors*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama da subunidade de fibronectina.....	26
Figura 2 - Formação de endossomo e a via de reciclagem.....	28
Figura 3 - Formação do endossomo primário e classificação das cargas.....	30
Gráfico 1 - Elevada concentração de glicose leva à diminuição da migração de células NIH 3T3.....	38
Figura 4 - Células HG secretam menos fibronectina	41
Gráfico 2 - Elevada concentração de glicose reduz a expressão proteica da subunidade $\beta 1$ de integrinas.....	42
Figura 5 – Glicose elevada reduz a distribuição de subunidades $\beta 1$ de integrinas na superfície de células NIH3T3.....	44
Figura 6 - Elevada concentração de glicose reduz a distribuição de vesículas contendo EEA1 e a expressão desta proteína em células NIH3T3.....	47
Figura 7 - Elevada concentração de glicose não afeta a distribuição ou expressão de Rab7.....	48
Figura 8 - Elevada concentração de glicose reduz a distribuição e expressão de Rab11 em células NIH3T3.....	50
Figura 9 - Elevada concentração de glicose não altera a distribuição, mas aumenta a expressão proteica de Rab4.....	53

Figura 10 - Efeitos (propostos) da elevada concentração de glicose sobre a endocitose em células NIH3T3.....	63
---	-----------

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Relação entre integrinas e GTPases Rab.....	61
---	-----------

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Considerações Gerais.....	19
1.2 Captação e metabolismo da glicose	20
1.3 Efeitos e complicações causadas pelo aumento da glicose.....	21
1.4 Migração celular e hiperglicemia crônica	23
1.5 Tráfego intracelular	27
1.6 GTPases Rab	29
2 OBJETIVO GERAL	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Materiais	33
3.2 Cultivo celular	33
3.3 Ensaio de migração em Transwell	34
3.4 Imunocitoquímica.....	34
3.5 Marcação de subunidade $\beta 1$ de integrinas em células vivas.....	35
3.6 Western Blotting	36
3.7 Análise estatística.....	37
4 RESULTADOS	38
4.1 Efeitos da elevada concentração de glicose sobre a migração de células NIH 3T3.....	38

4.2 Glicose elevada reduz a secreção e fibrilogênese de fibronectina em células NIH3T3.....	39
4.3 Elevada concentração de glicose reduz a expressão proteica da subunidade β 1 de integrinas.....	42
4.4 Efeitos da elevada concentração de glicose na endocitose em células NIH3T3.....	45
4.4.1 <i>Elevada concentração de glicose reduz a distribuição e expressão de Early Endosome Antigen 1 (EEA1)</i>	45
4.4.2 <i>Elevada concentração glicose não afeta a expressão e distribuição do Rab7</i>	48
4.4.3 <i>Elevada concentração de glicose diminui os endossomos contendo o marcador Rab11</i>	51
4.4.4 <i>Elevada concentração de glicose aumenta a expressão do marcador Rab4</i>	54
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

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

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

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

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

1.2 Captação e metabolismo da glicose

A glicose ($C_6H_{12}O_6$) é um dos principais monossacarídeos utilizados como fonte de energia pelos seres vivos, tendo importante papel no metabolismo e homeostase celular, uma vez que é o principal precursor para síntese de ATP. Sua captação ocorre por difusão facilitada, mediada principalmente por uma família de proteínas transmembrana denominadas transportadores de glicose (GLUT). No meio intracelular, a maior parte do metabolismo da glicose ocorre via glicólise. Nesta etapa, um conjunto de reações químicas sucessivas catalisadas por diferentes enzimas citoplasmáticas geram ao final piruvato, ATP e oxida-se o NAD^+ para NADH, como mostrado na equação geral da glicólise abaixo. Dependendo das condições do ambiente celular (presença ou privação de oxigênio), estes produtos podem ser direcionados para a via anaeróbia (neste caso, fermentação láctica) ou para vias aeróbias (respiração celular – ciclo do ácido cítrico e cadeia respiratória).

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

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

1.3 Complicações causadas pela hiperglicemia

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4 Migração celular e hiperglicemia

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

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

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

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

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

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

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

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

Figura 1 - Diagrama ilustrando a molécula de fibronectina.

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

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

1.5 Tráfego intracelular

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.6 GTPases Rab

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

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

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

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

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

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

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

2 OBJETIVOS

Avaliar, em fibroblastos NIH3T3, os efeitos da elevada concentração de glicose (25 mM) sobre a via de reciclagem de integrinas, especialmente daquelas contendo a subunidade $\beta 1$, utilizando como marcadores: EEA1 (endossomo inicial), Rab4 (reciclagem lenta), Rab11 (reciclagem rápida) e Rab7 (endossomos tardios). Adicionalmente, avaliar a organização da matriz pericelular de fibronectina, que depende não só da secreção desta glicoproteína quanto da atividade de integrinas $\alpha 5\beta 1$.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os reagentes para cultivo celular e fibronectina foram obtidos da *Invitrogen Life Technologies Inc.* (Grand Island, NY). Sais, fixador e outros reagentes foram provenientes da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO). Anticorpos anti-Rab7 (#9367S), anti-Rab11 (#5589S) e anti-EEA1 (#2411S) foram obtidos da *Cell Signaling Technology* (Boston, MA). Anticorpos contra fibronectina (AB23759), subunidade $\beta 1$ de integrinas (AB52971) e Rab4 (AB13252) foram obtidos da *Abcam* (Cambridge, UK). Anticorpos secundários foram obtidos da *Jackson Immunolabs* (Pennsylvania, USA). Vectashield foi proveniente da *Vector Laboratories* (Burlingame, CA). O tampão de lise, RIPA, foi obtido da Santa Cruz (Santa Cruz, CA).

3.2 Cultivo celular

Fibroblastos da linhagem NIH 3T3 foram gentilmente doados pelo Professor Alan R. Horwitz (Universidade da Virginia). As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina contendo 5 mM (baixa concentração de glicose – LG) ou 25 mM de glicose (alta concentração de glicose – HG) por 21 dias a 37°C, em atmosfera úmida contando 8% CO₂ para a realização dos experimentos. Passagens semanais foram realizadas.

3.3 Ensaio de migração em Transwell

O ensaio de migração foi realizado utilizando o sistema *transwell*, com membrana com poros de 8,0 μm (Corning Inc). As membranas foram previamente cobertas com fibronectina (1 $\mu\text{g/ml}$) e incubadas por 1 hora em estufa umidificada a 37°C; a seguir foram lavadas em PBS. Para o ensaio, cerca de 5×10^4 células foram semeadas na câmara superior em meio DMEM contendo 1% SFB, enquanto na câmara inferior adicionou-se meio contendo 10% SFB. Após incubação de 16 h as células ainda presentes na superfície superior da membrana foram removidas por raspagem e as células que migraram (porção inferior da membrana) foram fixadas em uma solução de 4% paraformaldeído em tampão PBS, pH 7,4, por 15 minutos à temperatura ambiente (TA). Posteriormente foram coradas com solução de Cristal Violeta 0,1% (em água destilada) por 15 minutos. As membranas foram recortadas, montadas em lâminas e fotografadas ao microscópio (25 campos, objetiva de 20x) em microscópio Nikon Eclipse E600 equipado com a câmera óptica CF160. As células foram contadas utilizando o programa Image J (NIH) e os resultados foram expressos como número de células/área.

3.4 Imunocitoquímica

Cerca de 1×10^4 células foram semeadas sobre lamínulas de vidro de 18 mm de diâmetro previamente cobertas com fibronectina (1 $\mu\text{g/ml}$). As células foram mantidas por 20 h em condições padrão de cultura. Para evidênciação de EEA1 e Rab7, as células foram fixadas por 30 min. em solução de paraformaldeído 4% contendo sacarose 5% em tampão PHEM (PIPES 60mM, HEPES 2mM, EGTA 10mM e MgCl_2 2mM, pH 7.4) e

posteriormente foram permeabilizadas por 5 min. na mesma solução contendo Triton-X-100 0,5%. Para evidenciação de Rab4, Rab11 e fibronectina, utilizou-se tampão PBS, pH 7,4, ao invés de PHEM. Após lavagens em tampão, o bloqueio foi realizado com soro normal de cabra (NGS) 10% e glicina 100 mM no tampão apropriado, por 1 h à TA. Após sucessivas lavagens em tampão, a incubação com anticorpo primário (anti-Rab4 1:400, anti-Rab11 1:50, anti-Rab7 1:50, anti-EEA1 1:50 e anti-fibronectina 1:200) foi realizada por 18 h a 8°C. As células foram novamente lavadas com tampão apropriado para a posterior incubação com o anticorpo secundário conjugado com Alexa 488 na diluição 1:100 (Jackson ImmunoResearch TM) por 1 h a TA. Os filamentos de actina foram corados com faloidina conjugada à rodamina (1:1000, InvitrogenTM), por 1 h nas mesmas condições. As lamínulas foram montadas com Vectashield®/DAPI. Como controle das reações, o experimento foi realizado na ausência de anticorpo primário. O microscópio confocal Zeiss LSM 780 acoplado com um laser multifoton (Spectraphysics) foi utilizado para obtenção dos resultados (objetiva de 63x).

Para a análise de fibronectina secretada as células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro sem cobertura e as foram processadas conforme descrito acima, mas sem permeabilização.

3.5 Marcação de subunidade $\beta 1$ de integrinas em células vivas

Placas com fundo de vidro foram cobertas com 1 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina e incubadas a 37 °C durante 1 hora antes do ensaio. Cerca de 1×10^4 células foram semeadas e incubadas por 18 horas. As células foram lavadas 2 vezes com PBS e então foram acrescidos 100 μl do meio completo refrigerado (4 °C) contendo o anticorpo anti-integrina beta 1 conjugado com FITC (ab23834, 1:250). As placas foram mantidas no gelo por 1 h e posteriormente lavadas com PBS. As células foram filmadas em microscópio confocal Nikon (A1R MP) durante 20 minutos, com intervalo de 11 segundos

entre as fotos. As imagens geradas foram processadas no software Image J. Infelizmente houve *photobleaching*, de forma que apenas a ligação inicial da integrina foi utilizada. Não foi possível acompanhar a internalização e reciclagem, conforme pretendido inicialmente.

3.6 Western Blotting

Aproximadamente 4×10^5 células/poço foram semeadas em placas de 6 poços e mantidas por 20 h em cultura. Após sucessivas lavagens com PBS gelado, a lise celular foi realizada com tampão RIPA contendo inibidores de proteases e de fosfatases. As amostras foram centrifugadas (10000 rpm, 15 minutos) e a concentração de proteínas do sobrenadante foi determinada pela utilização do kit de detecção de proteína BCA (Pierce). Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% ou 15% (SDS-PAGE) em TA, pelo método de Laemmli. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando um sistema de transferência da Biorad e o bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado por 6 h a TA, com soro normal de cabra 5% (NGS) para Rab7 e integrina $\beta 1$, caseína 5% (leite em pó desnatado) para Rab4 e EEA1 e soro albumina bovina 15% para Rab11. A incubação com anticorpos primários (anti-Rab7 1:2000, anti-Rab11 1:2000, anti-Rab4 1:1000, anti-EEA1 1:1000 e anti- $\beta 1$ integrina 1:500) foi realizada por 18 h a 4°C, seguida de sucessivas lavagens com tampão TBT-T (Tris 20 mM, NaCl 136 mM e Tween-200 1%). A incubação com anticorpo secundário marcado com peroxidase (1:1000) foi feita por 1 h a TA. Os resultados foram obtidos por quimiluminescência (kit ECL, GE) e as imagens foram obtidas em fotodocumentador (DNT Bioimage Systems MF-ChemiBis 3.2). A densitometria das bandas foi realizada no software Image J (NIH).

3.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de 2-3 experimentos independentes. Foram submetidos ao teste t de *Student* para comparação entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas acima de $P < 0.05$ (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da elevada concentração de glicose sobre a migração de células NIH 3T3

Fibroblastos da linhagem NIH3T3 foram expostos à alta concentração de glicose (25 mM) por 21 dias, enquanto as células controle foram cultivadas em meio contendo 5 mM de glicose. As células foram submetidas a ensaios de migração em transwell sobre matriz de fibronectina (1µg/ml) e, como esperado, houve uma redução de 30% na migração celular (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Elevada concentração de glicose reduz a migração de células NIH3T3

A migração celular foi estudada através de ensaios de migração em transwell com cobertura de 1 µg/ml de fibronectina, como descrito na seção de materiais e métodos. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (DPM) do número de células por área. (**) $p < 0,01$, de acordo com o teste t de Student.

4.2 Efeitos da elevada concentração de glicose sobre a secreção de fibronectina por células NIH3T3

A fibronectina é um exemplo de proteína secretada pelos fibroblastos, é organizada numa matriz pericelular com auxílio da integrina $\alpha 5\beta 1$ e é muito importante para a migração celular. Para avaliar se a secreção e fibrilogênese da fibronectina estavam alteradas em células expostas à glicose elevada, verificamos, por imunocitoquímica, a distribuição da fibronectina total (em células permeabilizadas) e da fibronectina pericelular (em células não permeabilizadas).

Como demonstrado na Figura 4, células expostas à glicose elevada apresentaram menor marcação para fibronectina total, sugerindo menor produção desta proteína. Além disso, a matriz pericelular de fibronectina estava reduzida naquelas células. De fato, células expostas à glicose elevada apresentaram alguns grumos de fibronectina e poucas fibrilas organizadas na sua superfície, em comparação às células controle (Figura 4).

Figura 4- Imunomarcação de fibronectina pericelular total (A-B) e de fibronectina total após permeabilização (C-D) em células NIH3T3 cultivadas com glicose 5 mM (A, C) ou glicose 25 mM (B, D). Fibronectina em verde, citoesqueleto de actina em vermelho e núcleo em azul (DAPI). Barra = 20 μ m.

Figura 4 – Glicose elevada reduz a secreção e fibrilogênese de fibronectina em células NIH3T3.

4.3 Elevada concentração de glicose reduz a expressão proteica da subunidade $\beta 1$ de integrinas.

A subunidade $\beta 1$ foi escolhida por estar presente em 12 dos 24 heterodímeros que constituem a família das integrinas. A análise da integrina foi feita por ensaios de western blotting e também por ensaios de ligação de um anticorpo anti- $\beta 1$ conjugado com FITC.

Como demonstrado no gráfico 2, houve redução na expressão proteica de $\beta 1$ em células expostas à glicose elevada. A Figura 5 mostra que a imunomarcação de $\beta 1$ na superfície de células expostas à glicose elevada também é menor, em comparação às células controle.

Gráfico 2 - Elevada concentração de glicose diminui a expressão da subunidade $\beta 1$.

O gráfico mostra os resultados (média $\pm$ DPM) de densitometria das bandas correspondentes a $\beta 1$ em relação à β actina (controle da reação), derivados de 3 experimentos independentes. Um experimento representativo está demonstrado à direita.

Figura 5- Imunomarcacão de subunidade $\beta 1$ de integrinas utilizando um anticorpo primário fluorescente (FITC) que reage com o domínio extracelular da proteína. Célula controle (A-B) e células exposta à glicose elevada (C-D). Barra = 20 μm .

Figura 5 – Glicose elevada reduz a distribuição de subunidades $\beta 1$ de integrinas na superfície de células NIH3T3.

4.4 Efeitos da elevada concentração de glicose na endocitose em células NIH3T3

4.4.1 Elevada concentração de glicose reduz a distribuição e expressão de Early Endosome Antigen 1 (EEA1)

A via de reciclagem das integrinas inicia-se com a formação de endossomos a partir da membrana plasmática. Esses endossomos se unem e contêm *early endosome antigen1* (EEA1), sendo este o primeiro ponto de checagem das proteínas que permaneceram em contato com o meio extracelular.

A figura 6 mostra a distribuição de vesículas marcadas com EEA1 em células controle e expostas à glicose elevada. EEA1 estava presente em pequenas vesículas distribuídas em todo o corpo celular, incluindo a periferia celular e algumas vezes próximo ao núcleo (Figura 6). Não foram observadas diferenças na distribuição, mas a imagem de células expostas à glicose elevada é sugestiva de ligeira redução no número de vesículas. Este resultado é coerente com o resultado do western blotting para EEA1, que mostrou redução da expressão desta proteína (Figura 6).

Figura 6- Efeitos de elevada concentração de glicose sobre a distribuição de endossomos contendo EEA1 (imunocitoquímica) e sobre a expressão desta proteína em células NIH3T3 (Western blotting). O painel mostra células controle (A-B) e células expostas à glicose elevada (C-D). Na parte superior do painel, o EEA1 é mostrado em verde, citoesqueleto de actina em vermelho e núcleo em azul (DAPI). Barra = 20 μ m. O gráfico mostra resultados de densitometria de bandas derivadas de 3 experimentos independentes de western blotting (média $\pm$ DPM). (*) $p < 0,05$, de acordo com o teste t Student. Um experimento representativo está demonstrado na figura.

Figura 6 - Elevada concentração de glicose reduz a distribuição de vesículas contendo EEA1 e a expressão desta proteína em células NIH3T3.

4.4.2 Elevada concentração glicose não afeta a distribuição e expressão de Rab7

Ao passarem pelo endossomo de classificação (EEA1), os endossomos são triados para reciclagem ou para degradação por lisossomos. As moléculas destinadas à degradação são encaminhadas por endossomos tardios contendo o marcador Rab7.

Na figura 7, observamos células contendo vesículas de Rab7 distribuídas uniformemente no corpo celular, na região perinuclear e ausente nos processos celulares. Não foram observadas diferenças significativas entre as células controle e expostas à glicose elevada. Os ensaios de western blotting confirmaram que não há diferença na expressão desta proteína.

Figura 7- Efeitos de elevada concentração de glicose sobre a distribuição de endossomos contendo Rab7 (imunocitoquímica) e sobre a expressão desta proteína em células NIH3T3 (Western blotting). O painel mostra células controle (A-B) e células expostas à glicose elevada (C-D). Na parte superior do painel, o Rab7 é mostrado em verde, citoesqueleto de actina em vermelho e núcleo em azul (DAPI). Barra = 20 μ m. O gráfico mostra resultados de densitometria de bandas derivadas de 3 experimentos independentes de western blotting (média $\pm$ DPM). (*) $p < 0,05$, de acordo com o teste t Student. Um experimento representativo está demonstrado na figura.

Figura 7 - Elevada concentração de glicose não afeta a distribuição e expressão de Rab7.

4.4.3 Elevada concentração de glicose diminui os endossomos contendo o marcador Rab11.

Os endossomos de reciclagem são encaminhados para a membrana celular, onde as moléculas carregadas estarão aptas a desenvolver novamente a sua função. A reciclagem pode ocorrer por uma via curta (endossomos contendo o marcador Rab4), ou por uma via longa (endossomos contendo o marcador Rab11).

Os endossomos em células controle estavam distribuídos por todo o citoplasma, concentrando claramente em uma pequena região próxima ao núcleo (Figura 8). A mesma distribuição foi observada em células expostas à glicose elevada, mas aparentemente a marcação estava mais discreta.

As análises por western blotting mostraram uma diminuição significativa de 30% de Rab11 em células expostas à glicose, quando comparadas com as células controle (Figura 8).

Figura 8- Efeitos de elevada concentração de glicose sobre a distribuição de endossomos contendo Rab11 (imunocitoquímica) e sobre a expressão desta proteína em células NIH3T3 (Western blotting). O painel mostra células controle (A-B) e células expostas à glicose elevada (C-D). Na parte superior do painel, o Rab11 é mostrado em branco, citoesqueleto de actina em vermelho e núcleo em azul (DAPI). Barra = 25 μ m. O gráfico mostra resultados de densitometria de bandas derivadas de 3 experimentos independentes de western blotting (média $\pm$ DPM). (*) $p < 0,05$, de acordo com o teste t Student. Um experimento representativo está demonstrado na figura.

Figura 8 - Elevada concentração de glicose reduz a distribuição e expressão de Rab11 em células NIH3T3.

4.4.4 Elevada concentração de glicose aumenta a expressão do marcador Rab4

Os endossomos marcados com Rab4 são responsáveis pela via de reciclagem rápida, ou seja, retiram as moléculas da dianteira das células e as devolvem rapidamente à superfície. Como observado na figura 9, os endossomos contendo Rab4 estavam distribuídos por todo corpo celular, mas em menor quantidade nos lamelipódios. Não foram observadas diferenças na distribuição destes endossomos entre as células controle e expostas à glicose elevada, devido à variabilidade entre as células de uma mesma população (Figura 9). Entretanto, ensaios de western blotting mostraram um aumento de 50% na expressão proteica desse marcador (Figura 9).

Figura 9- Efeitos de elevada concentração de glicose sobre a distribuição de endossomos contendo Rab4 (imunocitoquímica) e sobre a expressão desta proteína em células NIH3T3 (Western blotting). O painel mostra células controle (A-B) e células expostas à glicose elevada (C-D). Na parte superior do painel, o Rab4 é mostrado em verde, citoesqueleto de actina em vermelho e núcleo em azul (DAPI). Barra = 20 μ m. O gráfico mostra resultados de densitometria de bandas derivadas de 3 experimentos independentes de western blotting (média $\pm$ DPM). (*) $p < 0,05$, de acordo com o teste t Student. Um experimento representativo está demonstrado na figura

Figura 9 - Elevada concentração de glicose não altera a distribuição, mas aumenta a expressão proteica de Rab4

5 DISCUSSÃO

Durante a cicatrização, a migração de fibroblastos é um evento muito importante, já que estas células são responsáveis pela síntese e degradação de proteínas da MEC (por exemplo fibronectina e colágenos), assim como pela contração da ferida na fase tardia. Os ensaios de migração de células NIH3T3 expostas à glicose elevada durante 21 dias, utilizando Transwell, mostraram uma inibição de 30% da migração sobre fibronectina exógena (Gráfico 1). Esse resultado confirma estudos publicados anteriormente pelo grupo (ALMEIDA, 2011; LAMERS et.al., 2011), mostrando que a elevada concentração de glicose reduz a velocidade de migração e a direcionalidade de fibroblastos obtidos de cultura primária e também de outras linhagens celulares. Muito importante, este efeito sobre a migração foi semelhante comparando-se células derivadas de animais diabéticos e células de linhagem expostas à glicose elevada por períodos de tempo que variavam de 3 a 14 dias (LAMERS et al., 2011), validando este modelo *in vitro* para estudos de migração celular.

Outro efeito observado foi a inibição da maturação das adesões à fibronectina, um aumento do número de protrusões celulares improdutivas (que comumente retraem sem uma adesão efetiva à fibronectina) (LAMERS et al., 2011) e uma redução do espraio celular sobre fibronectina e colágeno I (ALMEIDA, 2011). Dentre as diversas proteínas envolvidas na adesão celular, a família de integrinas é a mais importante devido à amplitude de distribuição entre as células e variedade de receptores para MEC. Estas proteínas ligam-se a componentes da MEC e recrutam proteínas citoplasmáticas, formando ligações estáveis com o citoesqueleto de actina. Nesse contexto, as integrinas são uma parte integral de qualquer complexo de adesão e sua especificidade contribui para a capacidade de adaptação celular diante de mudanças na composição da MEC (HYNES, 2002; WORTH; PARSONS, 2008).

Estudos prévios ainda não publicados mostraram uma redução da distribuição de subunidades $\alpha 5$ e αv (prováveis $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$, que formam receptores de fibronectina) na superfície de fibroblastos derivados de ratos diabéticos (ALMEIDA et al., em preparação). Conforme observado no gráfico 2, as células expostas à glicose elevada mostraram uma diminuição da expressão proteica da subunidade $\beta 1$ de integrinas. Experimentos de ligação de anticorpos anti- $\beta 1$ fluorescentes à superfície de células vivas também confirmaram este resultado (Figura 5). Esses resultados contribuem para a compreensão da menor adesão e espraiamento de fibroblastos sobre diferentes substratos, já que a subunidade $\beta 1$ está presente tanto em receptores de fibronectina quanto em receptores de colágenos ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ por exemplo). Apesar da expressão da proteína total $\beta 1$ estar reduzida, a possibilidade de reciclagem deficiente ou modificada destes receptores deveria ser investigada por nós.

O fato de que a adição de fibronectina exógena à cultura melhorava a velocidade de células de animais diabéticos e de que aquelas células apresentavam redução da expressão de $\alpha 5\beta 1$ na superfície celular (importante para a fibrillogênese de fibronectina - DANEN et al., 2002; PANKOV; YAMADA, 2002) (ALMEIDA et al., em preparação) nos levaram a investigar os efeitos da elevada concentração de glicose sobre a produção e fibrillogênese de fibronectina. Como observado na figura 4, houve redução da fibronectina total e pericelular; além disso, as células expostas à glicose apresentavam grumos de fibronectina na superfície, mais do que fibrilas organizadas. É possível que este efeito esteja relacionado a uma deficiência na secreção proteica, já que evidências baseadas em microscopia eletrônica de transmissão sugerem estresse do retículo endoplasmático (LAMERS et al., 2011; SANTOS, em preparação). Na confirmação desta hipótese, outras proteínas além da fibronectina poderiam também ser afetadas, como por exemplo as integrinas.

A reciclagem de integrinas é um requisito para a migração celular (CASWELL; NORMAN, 2008). Esse mecanismo é bastante eficiente e a

maioria das integrinas é reciclada, enquanto uma pequena parte é degradada. O mecanismo de reciclagem é altamente regulado por GTPases Rab e seus efetores, tornando-o bastante seletivo. Para estudar os efeitos da glicose sobre a endocitose e reciclagem, nós avaliamos a distribuição e expressão de EEA1 (endossomos primários ou de classificação), Rab4 (participante da via rápida da reciclagem), Rab11 (participante da via lenta da reciclagem) e Rab7 (endossomos tardios).

Dentre as 60 Rabs conhecidas, algumas das mais bem descritas são Rab5, localizada nos endossomos primários, e Rab7, em endossomos tardios. A proteína EEA1 é um efetor de Rab5 e desempenha um papel fundamental na seleção da carga, brotamento do endossomo, motilidade do mesmo, ancoragem e fusão das membranas; funciona como um marcador de identidade (VOLTAN, et. al., 2013). Como visto na figura 6, o EEA1 estava presente em pequenas vesículas distribuídas por todo o corpo celular, incluindo a periferia, algumas vezes concentrando-se próximo ao núcleo. Houve pequena diminuição na quantidade de endossomos contendo EEA1 e expressão da proteína em células expostas à glicose elevada. Este resultado sugere que a glicose excessiva diminui a formação de endossomos primários, podendo afetar a endocitose de integrinas e seus ligantes.

Seguindo a endocitose pelos mecanismos dependentes de clatrina ou de caveolina (geralmente envolvendo Rab5 e Rab21), integrinas são levadas através de endossomos. Dentro desses compartimentos as moléculas são selecionadas e podem ser enviadas para endossomos tardios (Rab7) e lisossomos para degradação ou para a reciclagem, através de duas vias diferentes.

A proteína Rab7 está presente tanto nos endossomos primários quanto nos endossomos tardios e exerce um papel central como regulador do tráfego endossomo-lisossomo. Além disso, Rab7 tem participação na maturação do endossomo tardio, no direcionamento da migração endossomal, no posicionamento das porções *minus-end* e *plus-end* dos

microtúbulos e no transporte endossomo-lisossomo através de interação proteína-proteína em diferentes cascatas (WANG, et. al., 2011). Na figura 7, os endossomos contendo Rab7 estavam distribuídos uniformemente pelo corpo celular, próximos à região perinuclear, e ausentes nos processos celulares. Não foi observada diferença na distribuição de Rab7 entre os grupos, nem na expressão desta proteína. Esses resultados sugerem que, mesmo reduzindo os endossomos primários (que também contém Rab7) e a quantidade de carga internalizada, a formação dos endossomos tardios se manteve inalterada e, possivelmente, também a degradação de moléculas. Estes resultados sugerem que a quantidade de moléculas internalizadas destinadas à degradação não se alterou entre os dois grupos.

Rab4 e Rab11 são importantes para o recrutamento de efetores para a classificação e endereçamento das cargas em endossomos de reciclagem (SONNICHSEN, et al., 2000; RENZIS, et al., 2002). Essas Rabs também regulam a cinética de reciclagem a partir de endossomos; Rab4 controla a reciclagem rápida e a Rab11 controla a reciclagem lenta passando pelo compartimento perinuclear (MAXFIELD, et al., 2004). As integrinas costumam ser eficientemente recicladas para a membrana plasmática através da via dependente de Rab4 e da proteína cinase D1 (PKD1), ou movendo-se em um transporte de reciclagem no compartimento perinuclear antes de retornar para a membrana em uma via que requer Rab11, ADP-fator de ribosilação 6 (ARF6) e a proteína cinase B (PKB) (CASWELL; NORMAN 2006, 2008; JONES, et al., 2006; MARGANDANT, et al., 2011; PELLINEN; IVASKA, 2006). Essas vias diferem entre si pelas integrinas que carregam e vias de sinalização regulatórias (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação entre algumas integrinas e GTPases Rab

Integrina	GTPase	Associação Física	Outros componentes
$\beta 1$	ARF6 Rab11	Associação direta entre ACAP1 e $\beta 1$	ACAP1 indica um possível envolvimento da cobertura de clatrina na reciclagem de integrinas.
$\alpha 5\beta 1$	Rab11	Não reportada	Reciclagem dependente de E-HD1 promove <i>turnover</i> de adesões e migração sobre a fibronectina
$\alpha 5\beta 1$	Rab25	Associação direta entre $\beta 1$ e GTP-Rab25	Promove Invasão
$\alpha v\beta 3$	Rab4	Associação direta entre phospho-Ser916, PKD1 e $\beta 3$	Controla a relação entre $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$ /RTKs

Modificado de Caswell, P.; Norman, J., 2008. Relação entre as integrinas e seu marcador Rab (específico). Abreviaturas: ACAP1: Arf-GAP with coiled-coil; RTK: receptor de tirosina cinase; E-HD1: proteína contendo domínio EH; PKD1: proteína quinase D1.

Rab11 regula a via de reciclagem lenta e, conforme observado na figura 8, os endossomos contendo Rab11 estavam distribuídos por todo citoplasma e se concentravam em uma região próxima ao núcleo. Em células expostas à glicose elevada, a expressão proteica estava diminuída. Interessantemente, o efetor de Rab11, Rab11FIP1/RCP, parece contribuir para a reciclagem da integrina $\alpha 5\beta 1$ e para a migração celular (CASWELL, et al., 2008; POWELKA, et al., 2004). Essa integrina é importante para a

fibrillogênese da fibronectina que está reduzida nas células de diabéticos, assim como a própria integrina $\alpha 5\beta 1$.

Rab4 é responsável pela via rápida da reciclagem e, apesar de não ter sua distribuição alterada (devido principalmente à variabilidade intercelular), observou-se um aumento de 50% na sua expressão proteica promovido pela elevada concentração de glicose. Sabe-se que a Rab4 está envolvida com a reciclagem da integrina $\beta 3$ (WHITE et al., 2007; WOODS et al., 2004) e parece ter uma relação com a integrina $\beta 1$ (BLYSTONE, S. D. et al., 1999). Em situações onde a integrina $\alpha \nu \beta 3$ é ativamente reutilizada e competente para se ligar à fibronectina, a reciclagem da integrina $\alpha 5\beta 1$ é menor. Entretanto, quando há algum comprometimento na reciclagem ou efetividade de ligação da integrina $\alpha \nu \beta 3$, a integrina $\alpha 5\beta 1$ é amplamente reutilizada (CASWELL; NORMAN, 2008). Nossos resultados sugerem que Rab4 pode estar elevada pelo aumento da reciclagem de $\alpha \nu \beta 3$, já que a reciclagem da integrina $\alpha 5\beta 1$ via Rab11 pode estar reduzida.

Apesar da importância da maquinaria de endocitose para a migração celular, este é o primeiro relato de alterações em mecanismos de reciclagem envolvendo integrinas em células expostas à glicose elevada. Os estudos relacionando diabetes e GTPases Rab geralmente focam na reciclagem de transportadores de glicose (GLUT).

Nossos resultados sugerem que a elevada concentração de glicose prejudica a formação, fusão e classificação representada pela proteína EEA1, mas não altera a formação dos endossomos tardios e possivelmente a degradação das proteínas destinadas a este fim. As vias de reciclagem envolvendo Rab11 parecem estar diminuídas, enquanto as vias envolvendo Rab4 estão aumentadas. Esses resultados podem explicar parcialmente a baixa expressão de algumas integrinas na superfície de fibroblastos de animais diabéticos.

Figura 10 - Efeitos (propostos) da elevada concentração de glicose sobre a endocitose em células NIH3T3.

6 CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS ¹

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

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

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

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

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

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

BARKAN D.; CHAMBERS A. F. b1-Integrin: A Potential Therapeutic Target in the Battle against Cancer Recurrence. **Clin. Cancer Res.**, v.17, n.23, p. 7219–23. 2011.

¹ De acordo com:

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

BLYSTONE S. D., et al. A molecular mechanism of integrin crosstalk: $\alpha_5\beta_3$ suppression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates $\alpha_5\beta_1$ function. **J. Cell Biol.**, v. 145, p. 889–897. 1999.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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