Maíra Estanislau Soares de Almeida

**HIPERGLICEMIA E INTERAÇÃO FIBROBLASTO-MATRIZ
EXTRACELULAR – INFLUÊNCIAS NA ADESÃO E MIGRAÇÃO EM
SUBSTRATOS BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL**

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

**São Paulo
2011**

Maíra Estanislau Soares de Almeida

**HIPERGLICEMIA E INTERAÇÃO FIBROBLASTO-MATRIZ
EXTRACELULAR – INFLUÊNCIAS NA ADESÃO E MIGRAÇÃO EM
SUBSTRATOS BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL**

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Marinilce Fagundes dos Santos

Versão Original

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Almeida, Maíra Estanislau Soares de.

Hiperglicemia e interação fibroblasto-matriz extracelular - influências na adesão e migração em substratos bidimensional e tridimensional. / Maíra Estanislau Soares de Almeida. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Marililce 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: Hyperglycemia and fibroblast-extracellular matrix interaction - influence on adhesion and migration in two-dimensional and three-dimensional substrates

Descritores: 1. Diabetes Mellitus 2. Migração celular 3. Matriz extracelular 4. Adesão celular 5. Estresse oxidativo 6. Matriz tridimensional I. Santos, Marililce Fagundes dos II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0107/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maíra Estanislau Soares de Almeida.

Título da Dissertação: Hiperglicemia e interação fibroblasto-matriz extracelular -
influências na adesão e migração em substratos bidimensional e
tridimensional.

Orientador(a): 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 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 18 nas fls. 67 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 homeostase de glândulas Salivares, adesão e migração celular** do qual participou(aram) o(s) alunos **Daniele Nemer Breno, Maira Estanislau Soares de Almeida. Mariana Marin Monteiro** e o pesquisador **Marcelo Lazzaron Lamers**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **26.02.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2009.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária-Suplente
CEEA - ICB/USP

*À minha família pela dedicação, incentivo e apoio
constantemente nessa minha jornada.*

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e fé que me guiou durante todo o meu aprendizado.

À minha orientadora Mari Santos, pelo exemplo profissional e pessoal, pela amizade e confiança que depositou em mim. Obrigada por sempre me mostrar que sou capaz e me dar liberdade para o meu crescimento profissional e pessoal.

Às meninas do Laboratório de Biologia do Movimento Celular: Ana Flávia Pessoa, Cilene Lima, Gabriella Moraes, Juliana Florim, M^a Gabriela Soares e Mariana Monteiro. Obrigada pelos incríveis dias de convivência, trabalho, muita alegria, risadas e conversas. Obrigada.

À aluna de Iniciação Científica, Kelly Salzmänn, por ter me auxiliado em vários experimentos e por ter me proporcionando essa oportunidade única de aprendizado de orientá-la. Obrigada pela amizade e carinho.

À Sandra Coccuzo, pelo carinho, pelas discussões científicas, pela ajuda, pela amizade e por acreditar e confiar em mim.

Ao Prof. Marcelo Lamers, pelas inúmeras contribuições científicas, pelo aprendizado e paciência. Obrigada!

À Emília Ribeiro, pela disposição de sempre me ajudar e pela amizade.

À Profa. M^a Aparecida Borsatti pela amizade e carinho.

À secretária de Pós-Graduação, Celiana Sandrelainy Marchiori, por me auxiliar sempre quando necessário com as normas da Pós-graduação.

Aos meus amigos de ingresso e do Departamento: Adam Arai, Alex Shimura, Beatriz Cortez, Felipe Costa, Jonatas Bussador, Kelly Saito, Lázaro Wender, Maraysa Melo, Marley Januário, Matheus Adolffi, Michele Joana Alves, Murilo Vieira, Paola Branco, Priscila Sayame, Tatiane Kanno. Muito obrigada!

Aos professores: Alison Colquhoun, Chao Yun Irene Yan, Dânia Emi Hamassaki, Gláucia M M Santelli, M^a Inês Borella, Marília C. L. Seelaender, Patrícia Gama, Ruy Jaeger, Sérgio Oliveira e Silvy Stuchi Maria Engler. Obrigada a todos!

À minha orientadora de Iniciação Científica, Salete Smaniotto, pelo carinho e por ter me iniciado na área acadêmica. À todos da Universidade Federal de Alagoas que me proporcionaram a base da minha formação.

Aos meus pais Fernando e Lenilda e minhas irmãs Joana e Luísa, por terem vivido, mesmo longe todas as minhas alegrias, conquistas e todo o meu crescimento. Eu devo isso muito a vocês!

Ao meu Noivo Álvaro, pela paciência nas horas em que tudo parecia não ter solução. Pelo incentivo sempre constante, me mostrando que sou capaz e pelo amor incondicional durante essa minha jornada e sempre em nossas vidas.

Aos meus familiares, pelo carinho e torcida que sempre me incentivaram. À minha querida avó Marinita meu grande exemplo de força.

Aos meus amigos de sempre que, mesmo longe ou próximos, sempre torceram por mim. Obrigada!

Ao apoio financeiro da FAPESP (2009/06658-2) e CAPES.

*O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.*

*Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".*

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Almeida MES. Hiperglicemia e interação fibroblasto-matriz extracelular – influências na adesão e migração em substratos bidimensional e tridimensional [Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Tecidual]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Diabetes mellitus (DM) é caracterizado pela hiperglicemia crônica (HG), responsável por diversas complicações de longo prazo, como por exemplo a cicatrização deficiente. Nós investigamos os efeitos da HG na migração de fibroblastos dérmicos sobre colágeno e fibronectina, utilizando substratos bidimensional (2-D) e tridimensional (3-D). Observamos que a HG reduziu a velocidade de migração em ambas as matrizes. O tratamento sistêmico com antioxidantes preveniu esses efeitos. A velocidade de formação das protrusões celulares não foi afetada, mas houve uma redução na estabilidade das mesmas, sugerindo comprometimento das adesões. De fato, a HG reduziu a adesão celular sobre colágeno e fibronectina, enquanto o espreado celular estava reduzido sobre o colágeno e aumentado sobre fibronectina. Adicionalmente, a distribuição das subunidades $\alpha 1$, αv e $\alpha 5$ de integrinas foi afetada pela HG. Esse estudo mostrou que os efeitos da HG sobre a migração celular envolvem mecanismos básicos comuns a vários substratos, mas também mecanismos especificamente relacionados com a adesão à fibronectina, envolvendo possivelmente o estresse oxidativo e vias de sinalização iniciadas nas adesões.

Palavras-chave: Diabetes. Migração celular. Adesão. Estresse oxidativo. Matriz extracelular.

ABSTRACT

Almeida MES. Hyperglycemia and fibroblast-extracellular matrix interaction - influence on adhesion and migration in two-dimensional and three-dimensional substrates [Masters thesis in Cell and Tissue Biology]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Diabetes mellitus (DM) is characterized by chronic hyperglycemia (HG), which causes several complications, including impaired wound healing. We investigated the effects of HG on the migration of primary dermal fibroblasts on collagen and fibronectin, using two-dimensional (2-D) and three-dimensional (3-D) substrates. We observed that HG reduced migration velocity on both matrices. Systemic treatment with antioxidants prevented these effects. The velocity of protrusion formation was unaffected, but a decrease in protrusion stability was observed. HG slightly interfered with cell adhesion on collagen and fibronectin, but cell spreading was reduced on collagen and increased on fibronectin. Accordingly, the distribution of the integrin subunits $\alpha 1$, αv and $\alpha 5$ was affected by HG. This study shows that the effects of HG on cell migration involve basic mechanisms common to various substrates, as well as mechanisms specifically related to fibronectin, possibly involving oxidative stress and adhesion signaling.

Keywords: Diabetes. Cell migration. Cell adhesion. Oxidative stress. Extracellular matrix.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs - Produtos finais de glicação avançada
ATP- Adenosina 5'- trifosfato
DAG- Diacilglicerol
DMEM- Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
EROs- Espécies Reativas de Oxigênio
F-ACTINA- Actina filamentosa
GAPDH- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GAPs- Proteínas Ativadoras de Atividade GTPásica
GEFs- Fatores de Troca de Nucleotídeos de Guanina
GLUT- Transportador de glicose
GSH- Glutationa reduzida
HEPES- *(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
MEC- Matriz extracelular
MLC- Cadeia leve da miosina
MLCK- Cinase de cadeia leve de miosina
MMPs- Metaloproteínases
NAC- N-acetil-cisteína
NAD- β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH- β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo
PBS- Tampão salina-fosfato
PHEM- Tampão Pipes-Hepes-EGTA-MgCl₂
PKC- Protein cinase C
RB- Tampão de recuperação
ROCK – Rho-cinase
SBF- Soro fetal bovino
TBS- Tampão Tris-salina
Tris- Tris (hidroximetil) aminometano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Efeitos do aumento do metabolismo de glicose.....	17
Figura 2- Efeitos do Diabetes sobre a expressão de GLUT1	36
Figura 3- Efeitos do diabetes sobre a atividade máxima das enzimas hexoquinase, piruvato cinase e lactato desidrogenase	38
Figura 4- Análise da ultra-estrutura celular por microscopia eletrônica de transmissão	40
Figura 5- Evidenciação de actina filamentosa	42
Figura 6- Hiperglicemia reduz a velocidade de migração de forma dependente do estresse oxidativo.....	44
Figura 7- Velocidade e direcionalidade de migração em substrato 2-D de colágeno tipo I e fibronectina	46
Figura 8- Hiperglicemia diminui velocidade de migração em matriz 3-D composta de colágeno I e fibronectina.....	49
Figura 9- Velocidade de migração em matriz 3-D com uso de inibidor de metaloproteinases GM6001	50
Figura 10- Hiperglicemia reduz a direcionalidade em matriz 3-D.....	51
Figura 11- Velocidade de migração e direcionalidade das células em matriz 3-D na presença do inibidor de Rho cinase Y-27632	52
Figura 12- Hiperglicemia não afeta a velocidade de formação de protrusão, mas reduz a sua estabilidade	54
Figura 13- Hiperglicemia não altera a velocidade de formação de protrusões, mas aumenta o número de eventos produtivos	55
Figura 14- Hiperglicemia não afeta o número de células aderidas no colágeno tipo I	57
Figura 15- Hiperglicemia não afeta o número de células aderidas na fibronectina	58
Figura 16- Hiperglicemia reduz o espreado sobre o colágeno tipo I	59
Figura 17- Hiperglicemia afeta o espreado sobre a fibronectina.....	60
Figura 18- Hiperglicemia não afeta a polaridade de células aderidas em fibronectina por 1 hora	61
Figura 19- Hiperglicemia atrasa espreado inicial (20 minutos) no colágeno e na fibronectina	62
Figura 20- Hiperglicemia atrasa espreado de 1 hora no colágeno e na fibronectina	63

Figura 21- Hiperglicemia altera a distribuição da subunidade α-5	65
Figura 22- Hiperglicemia altera a distribuição da subunidade α-v	66
Figura 23- Hiperglicemia altera a distribuição da subunidade α-v	67
Figura 24- Hiperglicemia altera a distribuição da subunidade α-1	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Diabetes Mellitus	16
1.2 Diabetes Mellitus, captação de glicose e estresse oxidativo	16
1.3 Complicações do Diabetes- Cicatrização de feridas deficiente	19
1.4 Migração Celular – Aspectos básicos	20
1.5 Modelos experimentais de migração celular	22
<i>1.5.1 Migração celular em sistemas tridimensionais (3-D)</i>	22
2 OBJETIVO	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Materiais	26
3.2 Animais e indução do Diabetes Melittus	26
3.3 Tratamento com vitamina C e E	27
3.4 Cultura primária de fibroblastos dérmicos	27
3.5 Western Blotting para GLUT1	27
3.6 Atividade das enzimas da via glicolítica	28
3.7 Microscopia eletrônica de Transmissão	28
3.8 Real-Time PCR	28
3.9 Obtenção do colágeno a partir da cauda de rato	29
3.10 Determinação da concentração de colágeno	29
3.11 Cobertura bidimensional (2-D) com colágeno tipo I e fibronectina	30
3.12 Preparação da matriz tridimensional (3-D) de colágeno tipo I e fibronectina	30
3.13 Ensaio de migração em substrato 2-D e 3-D	31
3.14 Cimografia	31
3.15 Ensaio de adesão, espraiamento e polaridade	31

3.16 Imunocitoquímica	32
3.17 Caracterização do citoesqueleto de F-actina	33
3.18 Análise estatística	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Parâmetros fisiológicos- Efeitos da indução de Diabetes Mellitus	34
4.2 Diabetes aumenta a expressão gênica e protéica do transportador de glicose GLUT1 em fibroblastos	34
4.3 Diabetes aumenta a atividade das enzimas da via glicolítica em fibroblastos	37
4.4 Fibroblastos diabéticos apresentam diferenças ultra-estruturais	39
4.5 Diabetes altera o citoesqueleto de actina	41
4.6 Diabetes reduz a velocidade de migração de fibroblastos	43
4.6.1 <i>Em substrato 2-D de fibronectina os fibroblastos de diabéticos migram menos, e este efeito é prevenido pelo tratamento sistêmico com antioxidantes</i>	43
4.6.2 <i>Em substrato 2-D, o Diabetes reduz a velocidade de migração celular tanto sobre colágeno tipo I quanto sobre fibronectina</i>	45
4.6.3 <i>Diabetes dificulta a migração celular em gel misto de colágeno e fibronectina em substrato 3-D</i>	47
4.7 Diabetes não altera a velocidade de formação de protrusão, mas aumenta o número de protrusões instáveis, tanto em colágeno como em fibronectina	53
4.8 Diabetes não altera o número de células aderidas, mas reduz a área de espreadimento sobre o colágeno e aumenta sobre fibronectina	56
4.9 Diabetes altera a distribuição das subunidades de integrina $\alpha 5$, αv e $\alpha 1$	64
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de desordens metabólicas que acomete mais de 220 milhões de pessoas no mundo (World Health Organization, 2011) e, independentemente da sua etiologia, caracteriza-se pela hiperglicemia crônica (HG), que é a elevada concentração de glicose no sangue. As disfunções teciduais e celulares que acometem os pacientes diabéticos variam de acordo com o tipo celular e a sua função. Segundo Brownlee (2005), alguns tipos particulares de células e tecidos são mais vulneráveis a sofrer as alterações que a hiperglicemia causa. Essas células não conseguem equilibrar a entrada de glicose pelos seus transportadores, resultando em algumas complicações já conhecidas. Dentre as principais complicações causadas pelo DM destacam-se alterações microvasculares, neuropatia, retinopatia, nefropatia diabética e cicatrização deficiente (Tsilibary, 2003; Williams, 1992). A cicatrização deficiente origina as feridas crônicas, cujo tratamento tem um custo alto para o sistema público de saúde, além de um custo geral para a sociedade e para os indivíduos, principalmente devido à perda de produtividade e de qualidade de vida.

1.2 Diabetes Mellitus, captação de glicose e estresse oxidativo

A glicose é a principal fonte de energia utilizada pelos organismos eucariontes e tem papel central no metabolismo e na homeostase celular. Sendo uma molécula hidrofílica, a glicose não atravessa a barreira da membrana celular, necessitando utilizar proteínas transportadoras como os transportadores transmembranares do tipo GLUT (Scheepers et al., 2004). A captação de glicose não envolve gasto energético; após a ligação da glicose ao transportador, este sofre uma mudança conformacional, permitindo assim a entrada da glicose na célula. Para manter um gradiente de concentração, a glicose dentro da célula é fosforilada, podendo entrar na via glicolítica, de síntese de glicogênio ou na via das pentoses. Na via glicolítica a glicose sofre sucessivas transformações, gerando piruvato que pode entrar na mitocôndria e ser metabolizado no ciclo de Krebs para geração de ATP. Alternativamente, este piruvato pode ser convertido em lactato, pela ação da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (via anaeróbica).

Na hiperglicemia geralmente ocorre um aumento da captação de glicose pelas células, que ocasiona um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela mitocôndria. EROs são altamente reativas, podendo interagir com proteínas e alterar sua função. No diabetes os EROs em excesso interagem com a enzima GAPDH, diminuindo sua função. Na via glicolítica a GAPDH é a enzima responsável pela transformação de gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato. Com a inibição de GAPDH ocorre um acúmulo do próprio gliceraldeído-3-fosfato e dos metabólitos das reações anteriores, como frutose-6-fosfato e glicose-6-fosfato, os quais são substratos para a via dos polióis, via das hexosaminas, via da PKC e para a formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Figura 1).

Figura 1- Efeitos do aumento do metabolismo de glicose. A superprodução de superóxido mitocondrial induzida pela hiperglicemia ativa 4 vias que potencializam o dano celular: via do poliól, via das hexosaminas, via da PKC e formação de produtos finais de glicação (AGEs). O superóxido inibe parcialmente a enzima GAPDH, favorecendo a ativação destas vias paralelas devido ao acúmulo de metabólitos na via glicolítica.

Fonte: Brownlee, 2001

Os radicais livres e outras espécies reativas estão envolvidos em muitas doenças na medida em que uma formação aumentada destes se traduz frequentemente em lesão tecidual. O termo “estresse oxidativo” é muito usado na literatura referindo-se à situação na qual existe um desequilíbrio significativo entre a produção de radicais livres e defesas antioxidantes,

levando a um potencial dano celular (Rosen et al., 2001; Valko et al., 2007). Os compostos biologicamente mais relevantes dentre os radicais livres incluem o ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e o radical peroxil ($\cdot\text{RO}_2$), pertencentes ao grupo das EROS (Lopes et al., 2008).

As reações que envolvem radicais livres são essenciais em mecanismos de defesa como ocorre, por exemplo, com as células do sistema imune (sobretudo neutrófilos e macrófagos). Contudo, se estes radicais livres são produzidos em excesso, ou a sua eliminação se encontra comprometida, podem causar morte celular (Johansen et al., 2005; Halliwell, 1996). Para contrabalançar uma superprodução de radicais livres, os tecidos encontram-se munidos com uma rede endógena antioxidante (Johansen et al., 2005; Valko et al., 2007; Halliwell, 1996). Neste contexto é importante esclarecer a definição de antioxidante, que se refere a qualquer substância que, quando presente em pequenas concentrações comparado com as do substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação desse mesmo substrato (Rosen et al., 2001). Estão descritos na literatura inúmeros compostos antioxidantes embora apenas alguns sejam estudados em razoável detalhe, como por exemplo a vitamina E (α -tocoferol), a vitamina C (ácido ascórbico), os flavonóides e o ácido α -lipóico (Lopes et al., 2008).

Dentre as diversas vias bioquímicas intracelulares alteradas pela hiperglicemia, uma das maneiras mais prováveis do dano celular pode ser atribuída ao aumento do fluxo na via do poliol; a ativação desta via leva à diminuição do NADPH intracelular, consumido na redução de glicose para sorbitol. A regeneração de glutathione (GSH), que necessita de NADPH, ficaria então prejudicada, exacerbando o estresse oxidativo (Lee e Chung, 1999). Outra hipótese é o aumento da fração NADH/NAD^+ , que inibe a atividade da enzima GAPDH, aumentando trioses fosfato e, conseqüentemente, aumentando precursores de AGEs e diacilglicerol (DAG). Este, por sua vez, estimula a atividade da PKC (Hordijk, 2006).

A hiperglicemia também induz a geração de EROs pela ativação do complexo NADPH oxidase (Brownlee, 2001; Lee et al., 2003; Vecchione et al., 2006). Além do dano oxidativo, EROs também podem atuar como segundos mensageiros na regulação de vias sinalizadoras intracelulares e de expressão gênica, estimulando a produção de fatores de crescimento e de proteínas da matriz extracelular e alterando a expressão de metaloproteinases (Ha e Lee, 2003; Lee et al., 2003; Mason e Wahab, 2003; Ha e Lee, 2005).

1.3 Complicações do Diabetes- Cicatrização deficiente de feridas

As alterações metabólicas e celulares mencionadas anteriormente, causadas pela hiperglicemia crônica, são responsáveis por diversas complicações clínicas do diabetes de longo prazo. Neste contexto, a cicatrização de feridas está frequentemente comprometida. A cicatrização possui etapas sequenciais que envolvem ações coordenadas de eventos como migração de células para o local da lesão, inflamação, angiogênese, proliferação celular, deposição e remodelação da matriz extracelular (principalmente de colágeno) e contração da ferida e. Estes processos envolvem diferentes tipos celulares, principalmente células inflamatórias, fibroblastos/miofibroblastos e células epiteliais (queratinócitos e células endoteliais) (Martin, 1997).

No diabetes o processo de cicatrização encontra-se alterado por diversos fatores, como supressão da reação inflamatória, diminuição da angiogênese, alteração na proliferação de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, aumento da apoptose de queratinócitos e células endoteliais, alterações na deposição de colágeno, diminuição da produção de fatores de crescimento e aumento da produção de metaloproteinases (Goodson e Hunt 1977; Werner et al., 1994; Baumgartene-Parzer et al., 1995; Doxey et al., 1995; Mehlen et al., 1996; Tanaka et al., 1996; Shaw et al., 1997; Hehenberger et al., 1998; Sprovchicov et al., 2001; Deveci et al., 2005; Vaalamo et al., 1997; Muller et al., 2008; Pirila et al., 2007; Loots et al., 1999, 2002; Lerman et al., 2003).

Pelo fato de fibroblastos desempenharem papel central na cicatrização e reparação de tecidos lesados, e de serem o principal constituinte celular do tecido conjuntivo, responsáveis por sintetizar e degradar os componentes da matriz extracelular, sua função alterada no diabetes merece destaque. Apesar disso, poucos estudos têm demonstrado o papel da hiperglicemia sobre fibroblastos, especialmente sobre sua atividade migratória.

Loots et al. (1999, 2002), por exemplo, demonstraram que fibroblastos derivados de úlceras crônicas de pacientes diabéticos proliferam menos que aqueles derivados de pacientes normoglicêmicos e respondem diferentemente a fatores de crescimento mitogênicos. Mais recentemente, Lerman et al. (2003) mostraram que a migração de fibroblastos provenientes de camundongos diabéticos foi diminuída em torno de 75%; estes fibroblastos também eram menos responsivos à hipóxia, produziam menos fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e mais metaloproteinase-9 (MMP-9).

Estudos recentes desse laboratório mostraram que a hiperglicemia afeta negativamente a migração de fibroblastos, reduzindo sua velocidade e direcionalidade (Lamers, 2008). Este efeito foi acompanhado de um aumento da frequência de protrusões não produtivas e de uma nítida redução na estabilidade e persistência destas protrusões, assim como na maturação das adesões junto à matriz extracelular. Neste estudo observou-se também que muitos dos efeitos da hiperglicemia foram parcial ou totalmente resgatados pelo tratamento com um agente antioxidante (N-acetil cisteína – NAC), que inibe o estresse oxidativo que caracteriza a hiperglicemia. Os efeitos do estresse oxidativo causado pela hiperglicemia sobre o processo cicatricial não estão esclarecidos, mas é possível que diversas etapas da cicatrização, assim como diversas funções dos fibroblastos, sejam afetados por ele.

1.4 Migração Celular – Aspectos básicos

Migração celular é um processo biológico fundamental em todos os organismos multicelulares e é importante não apenas durante o desenvolvimento, mas também em eventos como reparo tecidual e sobrevivência imunológica. Durante a migração, as células interagem com a matriz, que é responsável por prover às células sinais físicos e químicos que orquestram e direcionam seu movimento. Exceto por células amebóides (Lammermann et al., 2008), a migração da maioria das células consiste em quatro eventos sequenciais básicos, que ocorrem de maneira cíclica: (1) protrusão da parte dianteira do corpo celular, (2) adesão à matriz extracelular, (3) deslocamento do corpo celular, e (4) retração da parte traseira (Ridley et al., 2003). Todo este ciclo depende de modificações do citoesqueleto de actina e tubulina (Horwitz e Webb, 2003), reguladas por proteínas de baixo peso molecular com atividade GTPásica pertencentes à família Rho (Takai et al., 2001).

É importante caracterizar as estruturas que são formadas durante os eventos sequenciais de migração. Quando a migração é iniciada, ocorre a polimerização de filamentos de actina na parte dianteira do corpo celular (*leading edge*), voltada para a direção de migração, formando um processo denominado lamelipódio. Dessa região, graças à polimerização de actina, podem ser projetados prolongamentos finos e longos com caráter exploratório, denominados filopódios. Lamelipódios e filopódios formam adesões imaturas junto ao substrato de matriz extracelular, denominadas adesões nascentes. Estas são estruturas pequenas e puntiformes, contendo receptores de adesão à matriz (integrinas) e moléculas sinalizadoras. À medida em que a célula avança algumas dessas adesões se desfazem enquanto outras amadurecem, tornando-se complexos focais e posteriormente adesões ou

contatos focais, que ancoram feixes de filamentos de actina e miosina II (fibras de estresse) e servem como pontos de ancoragem durante a migração. Nestas adesões focais, as integrinas ativadas são substituídas e podem deslocar-se em direção ao corpo celular, formando as adesões fibrilares.

Integrinas são receptores heterodiméricos formados por uma cadeia alfa (α) e uma cadeia beta (β). A combinação destas duas cadeias confere a estes receptores sua especificidade de ligação. Frequentemente os receptores de diversas proteínas da matriz extracelular possuem a subunidade $\beta 1$ ou $\beta 3$. Receptores contendo as subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$ e αv reconhecem fibronectina e proteínas similares (fibrinogênio, vitronectina p.ex.) enquanto os receptores de colágeno contem as subunidades $\alpha 1$ ou $\alpha 2$ (Hynes 1999, 2003).

Após o amadurecimento das adesões junto ao substrato a célula desloca seu corpo para a frente e a parte traseira é tracionada pelos feixes contráteis formados por fibras de actina e miosina II inseridos nas adesões. A atividade de miosina II é regulada pela fosforilação da cadeia leve (MLC), que é positivamente regulada pela cinase de cadeia leve de miosina (MLCK) e pela Rho cinase (ROCK) e negativamente regulada pela fosfatase da cadeia leve, que também é um substrato de ROCK (Riento et al., 2003). A fosforilação de MLC ativa a miosina, resultando no aumento da contratilidade e transmissão de tensão para os sítios de adesão. O ciclo termina com a liberação das adesões que foram utilizadas na parte traseira da célula, podendo estas entrar em uso novamente.

ROCK é uma proteína regulada por uma GTPase de baixo peso molecular pertencente à família Rho de GTPases. Esta família possui mais de 20 membros e é bastante conservada. As GTPases Rho melhor caracterizadas e mais amplamente distribuídas são RhoA, Rac1 e Cdc42 (Nobes e Hall, 1999; Sander e Collard, 1999). Estas proteínas ciclam entre um estado inativo (ligadas a GDP) e um estado ativo (ligadas a GTP). Quando ativadas, exercem seus efeitos por meio de uma vasta quantidade de proteínas efetoras, que regulam diversas funções celulares como migração, proliferação, diferenciação, apoptose, etc. ROCK é uma das proteínas efetoras reguladas por RhoA.

Na migração celular, cada etapa é regulada por GTPases específicas. A proteína Rac1 está principalmente envolvida na formação de lamelipódios e adesões imaturas, Cdc42 na formação de filopódios e Rho (isoformas A, B e C) na formação das fibras de estresse e na maturação de adesões (Ridley e Hall, 1992; Ridley et al., 1992). O balanço recíproco entre Rac1 e RhoA determina a morfologia celular e o comportamento migratório (Herbrand e Ahmadian, 2006). Adicionalmente, a atividade de Rac1 em fibroblastos parece estar

relacionada com migração randômica, já que uma redução desta atividade alterou o comportamento migratório de randômico para direcionado e persistente (Czuchra et al., 2005; Pankov et al., 2005).

A investigação sobre a base molecular da migração celular progrediu rapidamente nos últimos anos. Moléculas regulatórias importantes foram identificadas e os mecanismos de diversos processos elucidados, proporcionando potenciais alvos de intervenção terapêutica em doenças que envolvem deficiência de migração celular. No entanto, ainda existem muitas questões não esclarecidas sobre a maneira como as células estabelecem e mantêm a sua polaridade, assim como aspectos temporais e espaciais em ambientes que mimetizam o da célula *in vivo* (Ridley et al., 2003).

1.5 Modelos experimentais de migração celular

1.5.1 Migração celular em sistemas tridimensionais (3-D)

Os mecanismos de regulação da migração celular, principalmente de fibroblastos e células tumorais, têm sido estudados extensivamente em modelos de cultura bidimensional (2-D). No entanto, as discrepâncias entre o comportamento das células em cultura e *in vivo* têm levado um número cada vez maior de pesquisadores a utilizar modelos tridimensionais (3-D), que representam melhor, embora ainda de forma bastante incompleta, o microambiente tecidual. Os ligantes em modelos 2-D geralmente estão distribuídos homogeneamente e em baixas concentrações por unidade de área, enquanto modelos tridimensionais consistem em ligantes fibrilares compactados em graus variados.

Em culturas 3-D os fibroblastos migratórios possuem suporte dorsal e ventral de matriz extracelular, ao invés da polaridade dorso-ventral artificial associada aos modelos 2-D; por este motivo, adquirem uma morfologia alongada que lembra a dos fibroblastos *in vivo*. As células também apresentam pseudopódios grandes e na extremidade destes pseudopódios observam-se pequenas extensões achatadas equivalentes aos lamelipódios observados em 2-D (Heath e Peachey, 1989). Além disso, células em 2-D alteram espontaneamente sua direção de migração (migração randômica), o que está associado à elevada atividade de Rac1. Células em 3-D podem ser mais persistentes em direção e apresentam menor atividade de Rac1 (Czuchra et al., 2005).

A matriz 3-D inclui complexos componentes químicos, físicos e topográficos, e muitas estruturas celulares, como fibras de estresse e adesões focais, podem parecer menos óbvias do que as exacerbadas estruturas observadas em células achatadas sobre o substrato 2-D. No entanto, a complexidade do microambiente 3-D *in vivo* torna difícil estudar a influência de fatores físicos externos na migração celular (Cukierman et al., 2002).

Outro fator a ser considerado em matrizes 3-D é a sua maior flexibilidade; em geral, as células são capazes de detectar áreas de maior rigidez e migram em direção a elas (Lo et al., 2000). Integrinas também funcionam como mecanotransdutores, transformando sinais de força provenientes da matriz extracelular ou do citoesqueleto e transformando-os em sinais químicos intracelulares (Marques et al., 2008). As integrinas geram sinalização diferenciada em resposta a uma superfície 2-D rígida e simples, ou a uma matriz 3-D, maleável e complexa (Cukierman et al., 2002; Grinnell, 2003; Griffith e Schwartz, 2006).

A habilidade das células de migrar na matriz extracelular e de remodelá-la depende tanto das propriedades celulares quanto de características bioquímicas e físicas da matriz extracelular. A matriz extracelular pode ser remodelada por vários processos, incluindo síntese, contração e degradação proteolítica. Integrinas são os principais receptores que medeiam esta remodelação (Humphries et al., 2004; DeMali et al., 2003). Fibroblastos migratórios possuem atividade colagenolítica pericelular que lhes permite atravessar a matriz extracelular; a metaloproteinase MT1-MMP (MMP-14) é muito importante nesta atividade migratória (Sabeh et al., 2004). O papel das gelatinases MMP-2 e MMP-9 na migração, por outro lado, parece depender do tipo celular (Even-Ram e Yamada, 2005).

Uma questão importante que também tem sido muito debatida é o quanto as células realmente precisam da atividade de metaloproteinases para migrar. Em experimentos com células tumorais invasivas, por exemplo, o bloqueio da atividade de metaloproteinases promoveu uma alteração no modo de migração, que passou a ser amebóide e independente de proteases (Wolf et al., 2003). É possível que esta habilidade dependa tanto do tipo celular quanto do grau de ligações cruzadas na matriz extracelular (Even-Ram e Yamada, 2005).

De maneira geral, pode-se afirmar que em matrizes 3-D os processos celulares relativos à migração são mais discretos que aqueles já descritos em culturas 2-D; no entanto, sob condições em que a rigidez do substrato é aumentada, estes processos podem se tornar mais exacerbados.

Vários fatores como quimioatraentes, rigidez e topografia da matriz extracelular podem alterar a migração celular por modificar vias de transdução de sinal que afetam a organização do citoesqueleto. Modelos 2-D têm algumas vantagens, como p.ex. a facilidade para estudo da

dinâmica de receptores que medeiam interação célula-substrato, transdução de sinais, protrusão de membrana e organização do citoesqueleto. Embora alguns estudiosos argumentem que nada mimetiza em sua totalidade o real ambiente *in vivo*, os estudos *in vitro* tornam-se indispensáveis para definir a contribuição de processos individualmente, para que sejam esclarecidos processos como um todo (Even-Ram e Yamada, 2005).

Considerando a importância dos fibroblastos para a fisiologia do tecido conjuntivo e para o processo de cicatrização tecidual e a escassez de informações sobre os efeitos do diabetes sobre este tipo celular, especialmente sobre seu comportamento migratório, nesse estudo avaliamos os efeitos da hiperglicemia crônica sobre a migração de fibroblastos em matrizes de diferente composição (colágeno tipo I e/ou fibronectina) e dimensionalidade (2-D e 3-D).

2 OBJETIVO

Esse estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da hiperglicemia crônica e consequente estresse oxidativo sobre a migração *in vitro* de fibroblastos dérmicos, utilizando para isso sistemas bidimensionais (2-D) de diferentes composições (colágeno I ou fibronectina) e tridimensionais (3-D) (gel misto contendo colágeno I e fibronectina).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materias

Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino (SFB), penicilina, espreptomicina, fungizona e tripsina foram provenientes da Invitrogen Life Technologies Inc. (Grand Island, NY, EUA). Estreptozotocina, colagenase tipo I, fibronectina, ácido ascórbico, α -tocoferol, N-acetil-cisteína (NAC) e outros reagents foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os anticorpos foram provenientes: anti-GLUT1 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EUA), anti- β Actina (Sigma), anti- α 5, anti- α v e anti- α 1 (Chemicon, Billerica, MA, EUA).

3.2 Animais e indução do Diabetes Melittus

O protocolo de pesquisa utilizado está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Ética Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do ICB/USP, sob protocolo registrado sob nº 18 nas fls. 67 de livro 02.

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos com 2 meses de idade provenientes do Biotério Central do ICB/USP. Após um jejum de 12 h e sob anestesia (ketamina e xilazina - 0,2 ml/100 g), os animais do grupo experimental foram injetados intraperitonealmente com estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal, diluída em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,5), enquanto os animais controle receberam apenas o veículo. A estreptozotocina é uma droga que destrói especificamente células β do pâncreas (Junod et al., 1967). Para evitar uma hipoglicemia severa causada pela liberação de insulina durante a destruição das células β pancreáticas, foi disponibilizada sacarose em solução aquosa (30%) para todos os animais pelo período de 12 horas. A glicemia desses animais foi medida 24 horas após a injeção e no momento do sacrifício. Apenas animais com glicemia superior a 300 mg/dl foram considerados diabéticos. O peso corporal, a ingestão de alimento, a glicemia e a glicosúria foram medidos periodicamente, com a utilização de gaiolas metabólicas. Após 30 dias da injeção, os animais foram sacrificados por dose excessiva de ketamina e xilazina.

3.3 Tratamento com vitamina C e E

Alguns ratos controle e diabéticos receberam uma dose diária de vitamina E (α -tocoferol, 40 mg/kg) e C (ácido ascórbico, 100 mg/kg) por via intraperitoneal durante todo o período experimental. Este tratamento antioxidante sistêmico mostrou-se eficiente em ratos segundo Wyse et al. (2003).

3.4 Cultura primária de fibroblastos dérmicos

Após anestesia do animal realizou-se a tricotomia da região abdominal e remoção de um fragmento de pele de aproximadamente 4 cm². A remoção da derme foi feita em meio de cultura por raspagem com bisturi (em ambiente asséptico). Os fragmentos de derme foram digeridos com colagenase 0,1% por 1h a 37 °C em banho-maria, sob agitação constante. Após a digestão enzimática, inativou-se a enzima com meio DMEM contendo soro fetal bovino (SFB) 10%. Essa mistura foi centrifugada, as células foram suspensas em meio e transferidas para um frasco de cultivo. Os fibroblastos foram cultivados em meio DMEM contendo 20% SBF, antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml) e fungicida (Fungizona 1%, apenas na primeira passagem) em estufa umidificada contendo 8% de CO₂/92% ar. Posteriormente a concentração de SFB foi reduzida para 10% e as passagens foram semanais.

As células foram cultivadas em meio controle (glicose 5 mM) ou meio hiperglicêmico (HG, 25 mM de glicose). As células provenientes de animais tratados com antioxidante (vitaminas C e E) foram cultivadas nos seus meios correspondentes na presença de vitamina C (100 mg/L). As células foram utilizadas por até 5-6 passagens e o meio era substituído a cada 2 dias.

3.5 Western Blotting para GLUT-1

Células foram semeadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro até atingirem a confluência de 70%. Essas células foram lavadas com PBS gelado e posteriormente raspadas com tampão RIPA contendo inibidores de proteases (leupeptina, bestatina, pepstatina, Zincov e fenantrolina) para posterior dosagem de proteínas e preparação das amostras para eletroforese. Essas amostras (20 µg de proteínas) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% utilizando-se o método de Laemli e transferidas para uma membrana de

PDVF. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com leite desnatado 5% em PBS + tween 20 0,5% (45 minutos, temperatura ambiente - TA) e as membranas foram incubadas com anticorpo anti-GLUT1 (1:1000, BD Bioscience) ou anti- β Actina (1:10.000, Sigma) por 2 horas, TA. As membranas foram incubadas por 2 horas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP, Biorad), o qual foi detectado por quimioluminescência (ECL Supersignal, Pierce).

3.6 Atividade das enzimas da via glicolítica

As células (controle e diabética) foram homogeneizadas em meio contendo tampão (imidazol 50 mM; EDTA 2 mM; Mercapto-etanol 1 mM; pH 7,0). O homogenato foi centrifugado a 12.100 g por 20 minutos e utilizamos o sobrenadante para as determinações. A atividade das enzimas da via glicolítica (hexoquinase, piruvato quinase e lactato desidrogenase) foi determinada de acordo com o método descrito em Ferreira e Nicolau (1987). As análises enzimáticas foram determinadas pela leitura por espectrofotômetro a 340 nM por um período de 5 minutos, causada pela redução de NADP ou oxidação do NADH, utilizando cubeta de quartzo com 1 cm de comprimento de passagem de luz.

3.7 Microscopia eletrônica de Transmissão

As células foram tripsinizadas, centrifugadas (800 rpm, 2 minutos), e fixadas em solução de formaldeído 2,5% + glutaraldeído 2% tamponado em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas e todas as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e infiltradas em resina Spurr. Cortes ultrafinos foram coletados em tela de cobre (200 meshs) e analisados em um microscópio eletrônico JEOL.

3.8 Real-Time RT- PCR

Os fibroblastos foram cultivados até a confluência de 70%, quando foi realizada a extração de RNA com Trizol (Invitrogen, USA), obtenção de cDNA e reação de PCR em tempo real. Inicialmente foi realizada a padronização dos primers para detecção da expressão de GLUT1 e, como controle interno, de Ciclofilina A. A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada em termociclador (Applied Biosystems). Um μ g de RNA total foi adicionado a uma solução contendo oligo dt, dNTP Mix, tampão First-Strand 5x, ditiotretol e 200 U da

enzima transcriptase reversa (SuperScript II-Invitrogen). Os primers foram utilizados de acordo com a literatura ou desenvolvidos pelo programa *Primer Express* (Applied Biosystems, USA) e sintetizados. Para a expressão de GLUT1 foram utilizados os primers F- GGTGTGCAGCAGCCTGTGTA e R- GACGAACAGCGACACCACAGT, enquanto que para a expressão de Ciclofilina A foram utilizados os primers F- GCATACAGGTCCTGGCATCT e R- TTCACCTTCCCAAAGACCAC. Cerca de 20 ng de cDNA diluído em 25 µl do reagente SYBR Green PCR Master Mix e 150 nM de primers (sense –F e anti-sense-R) foram utilizados para a amplificação em cadeia por polimerase (PCR) no aparelho GeneAmp, que monitora a amplificação em tempo real. Os valores das amostras foram ajustados pela quantidade do controle interno (ciclofilina A) e comparados à média do grupo controle (valor normalizado como 1).

3.9 Obtenção do colágeno a partir da cauda de ratos

Para obtenção do colágeno tipo I, caudas de ratos controles foram coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais, mergulhadas em etanol 70% por 20 minutos e lavadas em água destilada estéril. Os tendões das caudas foram obtidos e fracionados com auxílio de pinça e tesoura, colocados em placas de Petri estéreis até o final da coleta e então transferidos para um erlemmeyer para a adição do ácido acético 0,1% (40 mL por cauda). O colágeno foi extraído após a incubação durante 16 horas, em temperatura ambiente, e por 2-3 dias adicionais a 4 °C, com agitação esporádica. O volume extraído foi transferido para tubo de 50 mL estéril e centrifugado a 12.000 x g por 1 hora a 4 °C para a remoção do material insolúvel. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado. Uma alíquota do sobrenadante foi obtida para a determinação da proteína total e do colágeno total. O sobrenadante foi armazenado à -20 °C.

3.10 Determinação da concentração de colágeno

A proteína total do colágeno tipo I extraído da cauda de ratos foi determinada utilizando-se o método do ácido bicinonínico (BCA), conforme descrito por Wiechelman et al. (1988). Este método combina a redução de Cu^{2+} a Cu^{+} por proteínas em meio alcalino (reação do biureto) com a detecção colorimétrica, muito sensível e seletiva, do íon Cu^{+} usando um reagente contendo ácido bicinonínico (Pierce). Nesta reação forma-se um produto de cor roxa, solúvel em água, com forte absorbância a 562 nm, que é linear com

concentrações crescentes de proteína, ao longo de uma gama extensa de concentrações de proteína (20 µg/ml – 2000 µg/ml). Os resultados foram expressos em µg de proteína/mL.

3.11 Cobertura bidimensional (2-D) com colágeno tipo I e fibronectina

Para a realização da cobertura das placas de Petri com proteínas de matriz para os ensaios em 2-D, colágeno tipo I (10 µg/ml) e fibronectina (1 µg/ml) diluídos em PBS foram adicionados mantidos em estufa de CO₂ a 37 °C por 1 hora para polimerização. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS 1X. Para evitar que as placas ressecassem, três ml de PBS foram adicionados às placas até utilização.

3.12 Preparação da matriz tridimensional (3-D) de colágeno tipo I e fibronectina

Para preparar a matriz tridimensional, foram adicionados em um tubo 212 µl (0,850 mg/mL) de colágeno I, 100 µl DMEM 10x, 100 µl de tampão RB 10x. Em outro tubo adicionou-se 500 µl de PBS, 10 µl de SFB, 10 µl de fibronectina derivada de plasma humano. Os tubos foram centrifugados a 4 °C por 3 minutos a 10.000 RMP. Para ajustar o pH (7.4) 60 µl de HCl foram adicionados à mistura, que foi bem homogeneizada no vórtex. A partir dessa preparação, 130 µl do gel foram colocados em placas de cultura contendo uma lamínula de vidro de 12 mm no centro. Os discos foram incubados a 37° C, por 2 horas, para a polimerização do gel inferior. Após este período, em um volume de 75 µl de gel, 2×10^3 células foram adicionados sobre a matriz já polimerizada e incubadas a 37° C por um período de 2 horas. Após este período, adicionou-se 2 ml do respectivo meio de cultura.

Para realização dos ensaios de migração, as placas permaneceram na estufa por 16 horas, período suficiente para que as células espraiassem e adquirissem a morfologia alongada e cilíndrica, típica de célula em 3-D. Após a confirmação de que as células encontravam-se em 3-D, o meio foi substituído por DMEM 10% contendo tampão HEPES (60 mM) e, por fim, uma camada de óleo mineral foi adicionada sobre o meio de cultura para evitar que ocorressem trocas gasosas durante o experimento.

Em alguns ensaios, utilizamos inibidores para avaliar: (1) degradação da matriz extracelular- inibidor de metaloproteinases (GM6001 10 µM ou 20 µM), e (2) a contratilidade celular: inibidor de Rho-cinase (Y-27632 30 µM). Os inibidores foram adicionados ao meio

de cultura DMEM contendo HEPES (60 mM), 10% SBF, antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml) e 1% aminoácido não-essenciais (NEEA) na hora da observação por *Time Lapse*. Nos ensaios com GM6001, realizamos como controle interno, ensaios com o veículo DMSO na mesma concentração utilizada do inibidor.

3.13 Ensaio de migração em substrato 2-D e 3-D

A observação da migração das células ocorreu em tempo real por *time lapse*, sob condições de baixa luminosidade e com o uso de câmera digital (Infinity II, Lumenera) acoplada a um microscópio invertido (Axiovert 135, Zeiss). Para a migração em 2-D e 3-D, utilizou-se objetiva de 10x e as imagens foram obtidas a cada 10 minutos durante um período de 10 a 24 horas. As imagens foram agrupadas sequencialmente e analisadas utilizando-se o programa de domínio público *Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). A trajetória de células individuais foi monitorada e obteve-se a velocidade e a distância percorrida pelas células. O índice de direcionalidade foi calculado como sendo a razão entre a distância relativa sobre a distância total percorrida pela célula

3.14 Cimografia

As mesmas condições já descritas para migração foram utilizadas, assim como o programa *Image J*. Para a obtenção dos cimogramas (Hinz et al. 1999) foram realizados filmes de curta duração, utilizando-se a objetiva de 5x, num período de 30 minutos e 1 hora com intervalos de 5 ou 10 segundos. Através da observação das seqüências de *time lapse*, selecionou-se uma protrusão e foi traçada uma reta orientada no sentido da protrusão e perpendicular à borda do lamelipódio. Para cada foto, esta reta foi lida como pontos de cinza e o resultado foi agrupado em seqüência, formando um gráfico no qual o eixo Y representa a distância avançada pela protrusão sob a linha e o eixo X representa o tempo. Foi traçada uma nova linha sobre o contorno obtido, onde o ângulo desta linha representa a velocidade de avanço da borda celular sob a linha.

3.15 Ensaio de adesão, espreadimento e polaridade

Para a análise da adesão as células foram tripsinizadas, contadas e cerca de $1,0 \times 10^5$ células foram ressuspensas em meio de cultura apropriado para recuperação da superfície por

1 hora. Nos ensaios com tratamento agudo com o antioxidante N-acetil-cisteína (NAC) as células foram tratadas por 1 hora antes do plaqueamento. As células dos diferentes grupos (controle, controle + NAC, diabético e diabético + NAC) foram semeadas em placas de Petri de 35 mm cobertas com colágeno (10 µg/ml) ou fibronectina (1 µg/ml); foram feitos ensaios com 20 minutos ou 1 hora de duração, nos quais as células permaneceram em estufa a 37°C contendo 8% CO₂ 92% ar. Após incubação, as placas foram colocadas imediatamente no gelo, o meio com células não aderentes foi removido e as células aderentes foram lavadas gentilmente com PBS gelado três vezes, fixadas com formaldeído 10% a TA, lavadas três vezes com PBS e uma vez com água destilada. As células aderentes foram coradas com hematoxilina/eosina (5 minutos/1 minuto, respectivamente) e fotografadas imediatamente (5 fotos de cada placa, utilizando a objetiva de 20x). As células foram contadas para a obtenção da média do número de células por placa. Para o espreadimento celular, a área ocupada por cada célula foi medida com o auxílio do programa Image J. O índice de polaridade foi calculado como a razão entre o comprimento do maior eixo que intersecta o núcleo (paralelo à direção do movimento) dividido pelo comprimento perpendicular a esse eixo

3.16 Imunocitoquímica

Para a análise da distribuição de subunidades de integrina $\alpha 5$, αv e $\alpha 1$, as células foram semeadas em lamínulas de vidro previamente lavadas. Essas lamínulas receberam cobertura de colágeno (10 µg/ml) ou fibronectina (1 µg/ml), conforme já descrito. Cerca de 2×10^4 células foram semeadas e permaneceram por 16 horas em estufa a 37°C contendo 8% CO₂ 92% ar. As células foram fixadas e permeabilizadas com paraformaldeído 4% contendo 0,5% Triton X-100 e 5% de sacarose em tampão PHEM (60 mM Pipes; 2 mM HEPES; 10 mM EGTA e 2 mM MgCl₂) por 5 minutos. Posteriormente foram pós-fixadas com paraformaldeído 4% em PHEM por 15 minutos e lavadas três vezes de 10 minutos com PHEM + glicina (100 mM). Os sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados com soro normal de cabra 20% (NGS) diluído em PHEM + glicina por 1 hora a TA. Após sucessivas lavagens, as células foram incubadas com anticorpo primário (anti- $\alpha 5$ 1:100, anti- αv 1:100 e anti- $\alpha 1$ 1:100) diluído em PHEM + glicina durante 1 hora à TA. Os controles negativos não receberam o anticorpo primário. Após a incubação, um novo ciclo de lavagens foi realizado e as células foram incubadas com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho) acoplado com Rodamina (1:100) por 1 hora a TA. Ao mesmo tempo ocorreu a evidênciação de F-actina com faloidina-Alexa 488 (1:100). A montagem da lamínula foi feita sobre lâmina de vidro

utilizando meio de montagem que contem DAPI (Vectashield). As fotos foram obtidas em microscópio confocal Zeiss utilizando a objetiva de 63x.

3.17 Caracterização do citoesqueleto de F-actina

As células foram fixadas e permeabilizadas com paraformaldeído 4% contendo 0,5% Triton X-100 e 5% de sacarose em tampão PHEM por 5 minutos. Posteriormente as células foram pós-fixadas com paraformaldeído 4% em PHEM por 15 minutos. Após sucessivas lavagens com PHEM + glicina (100 mM) as células foram coradas com faloidina-Alexa 488 (Molecular Probes) na concentração 1:100 por 1 hora e o núcleo com DAPI (Vectashield). As fotos foram obtidas em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axiovision), utilizando a objetiva de 63x.

3.18 Análise estatística

Para análise estatística utilizou-se o programa GraphPad Prism (versão 5.0). Os resultados foram submetidos ao teste t de Student ou análise de variância (Anova) seguida do pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significantes com $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros fisiológicos- Efeitos da indução de Diabetes Mellitus

Como pode ser observado na Tabela 1, todos os animais do grupo experimental (diabético e diabético + Vitaminas) apresentaram um quadro de aumento dos níveis de glicemia, de glicosúria e de consumo de ração, com redução de peso corporal. O tratamento com antioxidantes não reverteu nenhum dos parâmetros analisados.

Tabela 1 – Alterações de parâmetros fisiológicos após 30 dias da indução de diabetes

	Δ peso corporal (g)	Consumo de ração (g/15dias)	Glicemia (mg/dl)	Glicosúria (mg/dia)
Controle	116±12	435±20	90±5	6±3
Diabético	30±16**	746±31*	440±28*	1001±321**
Controle + Vit C/E	126±39	420±25	89±5	15±1
Diabético + Vit C/E	54±31**	650±26*	442±14*	1249±344**

Alterações dos parâmetros fisiológicos após 30 dias da indução de diabetes em ratos com o uso de estreptozotocina (média ± DPM). *P<0,01 e **P<0,001, segundo teste t de Student.

4.2 Diabetes aumenta a expressão gênica e protéica do transportador de glicose GLUT1 em fibroblastos

Para investigar se o aumento da glicemia dos animais promovia uma maior expressão de transportadores de glicose na superfície celular, realizamos RT-PCR em tempo real e *western blotting* para GLUT1, principal transportador nestas células. Observou-se um aumento de aproximadamente 3x na expressão de GLUT1 em fibroblastos de animais diabéticos quando comparados aos animais controle (Figura 2A). Este aumento também foi observado em células de animais controle cultivadas por 20 e 40 dias em meio de cultivo

contendo 25 mM de glicose, sugerindo que a glicose *per se* foi capaz de induzir um aumento na expressão de GLUT1.

Adicionalmente, foi realizada a quantificação de GLUT1 por densitometria após *western blotting* nos mesmos grupos experimentais e observou-se um aumento de 70% nos níveis desta proteína em fibroblastos de animais diabéticos, quando comparados aos respectivos controles (Figura 2B).

Figura 2- Efeitos do diabetes sobre a expressão de GLUT1. (A) Análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real do transportador de glicose GLUT1 em culturas primárias de fibroblastos da derme de ratos normoglicêmicos (controle) e diabéticos (B) Análise dos níveis protéicos de GLUT 1 . As amostras foram comparadas com o animal controle C1; C+20 e C+40 refere-se a células do animal C1 expostas ao meio hiperglicêmico por 20 e 40 dias, respectivamente. (n=3).

4.3 Diabetes aumenta a atividade das enzimas da via glicolítica em fibroblastos

A enzima hexoquinase participa do início do metabolismo de glicose e é responsável pela transformação de glicose em glicose 6-fosfato; esta é uma enzima-chave desta via, por catalisar uma etapa potencialmente limitante para o fluxo na via glicolítica. Observou-se um aumento de 40% na atividade da hexoquinase em fibroblastos de animais diabéticos. (Figura 3A). Este resultado sugere um aumento da captação e da utilização de glicose pelas células em meio hiperglicêmico.

A enzima piruvato cinase atua na geração de piruvato ao final da glicólise. Foi observado um aumento de 30% na atividade desta enzima em fibroblastos de animais diabéticos (Figura 3B). Este resultado sugere que o aumento na captação de glicose pelos fibroblastos de diabéticos resulta em um aumento na atividade glicolítica.

A enzima lactato desidrogenase participa da via anaeróbica através da conversão de piruvato em lactato. Não foram observadas alterações na atividade desta enzima entre os diferentes grupos analisados (Figura 3C), o que sugere que o possível aumento dos níveis intracelulares de piruvato está sendo direcionado para a mitocôndria, entrando no ciclo de Krebs

Figura 3- Efeitos do diabetes sobre a atividade máxima das enzimas hexoquinase, piruvato cinase e lactato desidrogenase em culturas primárias de fibroblastos da derme de ratos normoglicêmicos (controle) e diabéticos (n= 3, p<0,05). Os resultados foram expressos inicialmente em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína e estão representados como porcentagem em relação ao controle.

4.4 Fibroblastos diabéticos apresentam diferenças ultra-estruturais

Por meio de microscopia eletrônica de transmissão, observou-se que em fibroblastos de animais diabéticos (Figura 4D, E e F) um aumento no volume do retículo endoplasmático rugoso quando comparados aos fibroblastos controle (Figura 4A, B e C), o qual é um indicativo de estresse no retículo e/ou intensa atividade de síntese proteica. Esta observação, somada a uma maior presença de vacúolos intracelulares em fibroblastos de diabéticos, sugere que estas células apresentam alterações de síntese protéica, gerando proteínas não funcionais ou devido à elevada demanda ocasionada por menor funcionalidade de algumas proteínas.

A análise da ultra-estrutura celular também demonstrou que fibroblastos de animais diabéticos apresentaram maior número de mitocôndria, o que sugere uma maior atividade metabólica dessas células.

Figura 4- Análise da ultra-estrutura celular por microscopia eletrônica de transmissão em culturas primárias de fibroblastos da derme de ratos normoglicêmicos (A, B, C) e diabéticos (D, E, F). As setas apontam mitocôndrias. er= retículo endoplasmático; v= vacúolos.

4.5 Diabetes altera o citoesqueleto de actina

Para investigar as alterações morfológicas causadas pela hiperglicemia nos fibroblastos, evidenciamos o arranjo de F-actina nessas células. Os fibroblastos derivados de animais controle apresentaram uma morfologia espalhada, com filamentos de actina distribuídos principalmente no córtex celular e em fibras de estresse (Figura 5A). Algumas células apresentaram morfologia típica de células migratórias aderentes, com lamelipódios proeminentes (Figura 5C). Já as células derivadas de animais diabéticos apresentaram como alteração morfológica mais evidente a presença de uma “cauda” mais prolongada, talvez resultante de capacidade de contração reduzida da parte traseira da célula, por um possível mecanismo possivelmente envolvendo a miosina II (Figura 5B e 5D).

Figura 5- Evidenciação de actina filamentosa em fibroblastos dérmicos controle (A, C) e diabéticos (B, D). Técnica histoquímica utilizando faloidina-Alexa 488.

4.6 Diabetes reduz a velocidade de migração de fibroblastos

4.6.1 Em substrato 2-D de fibronectina os fibroblastos de diabéticos migram menos, e este efeito é prevenido pelo tratamento sistêmico com antioxidantes

Para esta análise, as células migrando em substrato 2-D de fibronectina foram observadas durante 10 horas com um intervalo de captura fotográfica de 10 minutos. Utilizando-se o software *ImageJ*, a sequência de imagens foi analisada e obteve-se a velocidade de migração das células presentes no campo. Foi observado que os fibroblastos de animais diabéticos apresentavam uma diminuição de 40% na velocidade de migração quando comparados aos fibroblastos de animais controle (Figura 6). Esta alteração aparentemente está ligada à presença de glicose, uma vez que fibroblastos controle cultivados por 10 dias em meio hiperglicêmico (25 mM) diminuíram em 20% sua velocidade de migração quando comparados a fibroblastos em meio controle, enquanto fibroblastos de diabéticos cultivados por 10 dias em meio controle (5 mM) apresentaram 30% de melhora na migração quando comparados àqueles cultivados em meio hiperglicêmico (Figura 6).

Estas alterações podem estar relacionadas ao estado metabólico destas células, uma vez que fibroblastos de animais controle e diabéticos tratados com antioxidantes e cultivados em meio com vitamina C apresentaram uma velocidade de migração respectivamente 30% e 10% superior àquelas observadas em fibroblastos controle.

Figura 6- Hiperglicemia reduz a velocidade de migração de forma dependente do estresse oxidativo. Velocidade de migração de fibroblastos derivados de ratos tratados e não tratados com vitamina C/E em substrato 2-D de fibronectina. Observar grupos controle + glicose: fibroblastos controles que foram expostos à alta concentração de glicose (25 mM); diabéticos + low glicose: fibroblastos diabéticos expostos à baixa concentração de glicose (5 mM). Nos grupos controle + vitamina e diabético + vitamina, as células foram obtidas de animais tratados sistemicamente com antioxidantes e mantidas em cultura em seus respectivos meios (glicose 5 mM ou 25 mM), contendo vitamina C (100 mg/L). Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes, com células obtidas de diferentes animais. Dados estatísticos são apresentados como média $\pm$ EPM, de acordo com *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. (*) = comparação em relação ao controle. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

4.6.2 Em substrato 2-D, o Diabetes reduz a velocidade de migração celular tanto sobre colágeno tipo I quanto sobre fibronectina

Utilizando diferentes substratos 2-D, fibroblastos derivados de ratos diabéticos mostraram uma acentuada diminuição na velocidade de migração sobre colágeno tipo I (36.17 ± 2.86 vs. $26.09 \pm 2.55^*$ $\mu\text{m/h}$, média $\pm$ EPM) e sobre fibronectina (23.50 ± 2.54 vs. $10.70 \pm 1.10^{***}$ $\mu\text{m/h}$, média $\pm$ EPM), quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 7A). Nas condições utilizadas neste trabalho, as células migraram mais rapidamente no colágeno do que na fibronectina. A deficiência de migração sobre fibronectina foi mais acentuada do que no colágeno (30% vs. 54%, respectivamente).

Observamos também uma discreta redução de 15% da direcionalidade de migração das células diabéticas sobre fibronectina (0.664 ± 0.03 vs. $0.560 \pm 0.03^*$, média $\pm$ EPM) (Figura 7B). Já sobre colágeno a hiperglicemia não alterou a direcionalidade da migração dos fibroblastos (0.556 ± 0.03 vs. 0.582 ± 0.03 , média $\pm$ EPM).

Figura 7- Velocidade e direcionalidade de migração em substrato 2-D de colágeno tipo I e fibronectina. A) Velocidade e B) Direcionalidade (índice D/T) de migração de fibroblastos derivados de ratos controle e diabéticos. Os resultados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes, com células derivadas de diferentes animais. Resultados apresentados como média $\pm$ EPM. (a) diferente do controle sobre colágeno; (b) diferente do diabético sobre colágeno; (c) diferente do controle sobre fibronectina. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ de acordo com *One-way ANOVA*.

4.6.3 Em substrato 3-D composto de colágeno I e fibronectina, o Diabetes reduz a velocidade de migração celular

Considerando que *in vivo* os fibroblastos dérmicos migram em um microambiente 3-D que contem elevadas concentrações de colágeno tipo I e de fibronectina, assim como outros componentes da matriz extracelular, estudou-se migração celular num gel 3-D misto contendo colágeno tipo I e fibronectina (Brekman e Neufeld, 2009). Empregando essas condições, a polaridade dorso-ventral acentuada observada em 2-D não estava presente, uma vez que as células encontravam-se imersas numa matriz que oferece suporte dorsal e ventral. A hiperglicemia reduziu a velocidade de migração em 56% ($106 \pm 10.7 \mu\text{m/h}$ vs. $46.57 \pm 4.37 \mu\text{m/h}$ ***, média $\pm$ EPM) (Figura 8), muito semelhante ao observado em fibronectina em 2-D. Interessantemente, as células migram 3-4 vezes mais rápido nesse substrato misto quando comparamos com substratos 2-D (Figura 8).

Para investigar se a redução na velocidade de migração em matriz 3-D estava relacionada com uma alteração na função de metaloproteinases, utilizamos um inibidor de amplo espectro (GM6001) na concentração de $10 \mu\text{M}$, para obtenção de inibição parcial das mesmas. Concentrações mais elevadas do inibidor inibiam completamente a migração de células controle e não foram, portanto, empregadas (resultados não apresentados). Observamos que o tratamento com GM6001 não afetou significativamente a velocidade de migração de células controle (Figura 9). Células diabéticas tratadas com inibidor tiveram 60% de redução na sua velocidade de migração quando comparadas ao seu respectivo controle ($70.89 \pm 5.15 \mu\text{m/h}$ vs. $27.99 \pm 2.77 \mu\text{m/h}$ ***). Este resultado é bastante semelhante ao observado entre células controle e diabéticas sem o inibidor (redução de 56%), ou apenas na presença de DMSO (54%).

Juntamente com a alteração da velocidade, na matriz 3-D a hiperglicemia diminuiu a direcionalidade de migração dos fibroblastos em 46% (0.434 ± 0.06 vs. $0.232 \pm 0.03^*$, média $\pm$ EPM) (Figura 10) Esse comportamento está relacionado, provavelmente com a resistência física oferecida pela matriz, aumentada pela heterogeneidade das distribuições das fibras de colágeno. As células em cultivo 3-D mostraram-se muito sensíveis ao solvente DMSO mesmo em baixas concentrações (0,25%), que per se reduziu a direcionalidade. Em comparação ao controle contendo DMSO, o inibidor GM6001 não modificou a direcionalidade em células controle ou diabéticas.

Para analisar a influência da hiperglicemia sobre a atividade motora dependente de miosina II e de GTPase Rho, utilizamos um inibidor de Rho-cinase (Y-27632) na concentração de 30 μM e observamos que as células controle com o inibidor tiveram sua velocidade reduzida em 54%, quando comparadas ao controle sem o inibidor ($106 \pm 10.70 \mu\text{m/h}$ vs. $47.93 \pm 2.48 \mu\text{m/h}^{***}$, média $\pm$ EPM) (Figura 11A). Na presença de Y-27632, a diferença na velocidade de migração entre células controle e diabéticas foi de apenas 23% ($47.93 \pm 2.48 \mu\text{m/h}$ vs. $37.11 \pm 2.10 \mu\text{m/h}^{**}$, média $\pm$ EPM), e a diferença entre os grupos diabéticos (sem e com inibidor) foi mínima ($46,57 \pm 4,37$ vs. $37,11 \pm 2,10 \mu\text{m/h}^{**}$, média $\pm$ EPM). Este resultado sugere que um dos maiores efeitos da hiperglicemia sobre a migração de fibroblastos pode estar relacionado à sua contratilidade.

. Ainda sobre a influência do inibidor de Rho cinase, avaliamos a direcionalidade das células e percebemos um aumento na direcionalidade da migração tanto nas células controle (0.322 ± 0.07 vs. $0.600 \pm 0.10^*$) quanto nas células diabéticas (0.194 ± 0.03 vs. $0,471 \pm 0.05^{**}$) (Figura 11B). Houve uma alteração morfológica das células controle e diabéticas na presença do inibidor de rho-cinase. As células previamente cilíndricas tornaram-se mais arredondadas, além de emitir finos e longos prolongamentos em direção randômica (resultados não apresentados). Em células diabéticas tornou-se mais evidente a extensão da parte traseira da célula, formando uma “cauda”; este aspecto é característico de comprometimento da capacidade contrátil da célula.

Figura 8- Hiperglicemia diminui velocidade de migração em matriz 3-D composta de colágeno I e fibronectina. Os resultados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes, com células obtidas de diferentes animais. Resultados apresentados como média $\pm$ EPM. *** $P < 0.001$ de acordo com *One-way ANOVA*.

Figura 9- Velocidade de migração em matriz 3-D com uso de inibidor de metaloproteinases GM6001 (10 µM). Grupos com DMSO foram realizados como controle interno do inibidor. Os resultados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes, com células obtidas de diferentes animais. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM.. (a) diferente do controle; (b) diferente do controle DMSO; (c) diferente do controle GM6001; (d) diferente do diabético; (e) diferente do diabético DMSO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ de acordo com *One-way ANOVA*.

Figura 10- Hiperglicemia reduz a direcionalidade em matriz 3-D. Direcionalidade da migração de fibroblastos derivados de ratos controles e diabéticos em substrato 3-D com ou sem o tratamento com inibidor de metaloproteinases GM6001 (10 μ M). Grupos com DMSO foram realizados como controle interno do inibidor. Os resultados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes, com células obtidas de diferentes animais. Resultados apresentados como média $\pm$ EPM. (a) diferente do controle; * $p < 0.05$, de acordo com *One-way ANOVA*.

A)

B)

Figura 11- Velocidade de migração e direcionalidade das células em matriz 3-D na presença do inibidor de Rho cinase Y-27632 (30 µM). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM. (a) diferente do controle; (b) diferente do diabético; (c) diferente do controle Y-27632. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ de acordo com *One-way ANOVA*.

4.7 Diabetes não altera a velocidade de formação de protrusões celulares, mas aumenta o número de protrusões instáveis, tanto sobre colágeno quanto sobre fibronectina

Embora células derivadas de ratos hiperglicêmicos tenham menor velocidade de migração, a velocidade de formação de protrusões, avaliada por cimografia durante 1 hora, não foi alterada (Figura 12A). No entanto, o comportamento das protrusões foi diferente entre os grupos. Enquanto que nas células controle a protrusão crescia progressivamente, em células hiperglicêmicas elas alternavam períodos de extensão e de retração (Figura 12B e 12C). Isso foi observado em ambas as matrizes de colágeno e fibronectina, sugerindo que a polimerização de actina não é afetada pela hiperglicemia, mas a estabilidade de protrusões, que principalmente depende da interação célula-matriz, sim.

Para analisar o papel do estresse oxidativo na formação das protrusões, as células derivadas de animais controle e diabéticos tratadas ou não com vitaminas C e E foram observadas durante 30 minutos sobre fibronectina, com um intervalo de captura de 5s (cimogramas). Utilizando-se o software *ImageJ*, foram observados e quantificados os eventos de membrana (número, estabilidade e velocidade de formação das protrusões) de todas as células que apresentaram comportamento migratório. Nos fibroblastos controle, aproximadamente 25% das células apresentaram mais de duas protrusões durante o período analisado, enquanto que no grupo diabético este número subiu para 40% (Figura 13A). Entretanto, as protrusões dos fibroblastos diabéticos eram mais instáveis, com uma taxa de retração de 20% contra os 5% apresentados pelos fibroblastos controles (Figura 13B). A velocidade de formação das protrusões não foi alterada (Figura 13C).

Para todos os parâmetros analisados, o tratamento sistêmico dos animais com antioxidantes preveniu completamente as alterações promovidas pela hiperglicemia (Figura 13). Quando os fibroblastos controle foram cultivados em meio hiperglicêmico por 10 dias, o seu comportamento migratório apresentava uma piora, quando comparado ao seu respectivo controle, com a presença de 30% de células com mais de duas protrusões e uma taxa de retração de 10%. Já os fibroblastos diabéticos cultivados por 10 dias em meio controle apresentavam uma melhora nos parâmetros migratórios quando comparados a diabéticos hiperglicêmicos, com 30% das células com mais de duas protrusões e uma taxa de retração de 12% (Figura 13).

Figura 12- Hiperglicemia não afeta a velocidade de formação de protrusões, mas reduz a sua estabilidade. A) Velocidade da formação de protrusão em fibroblastos derivados de ratos controle e diabéticos migrando em substrato 2-D de colágeno tipo I e de fibronectina. Resultados apresentados como média $\pm$ EPM de 3 experimentos independentes. B) Cimografia mostrando protrusões representativas em 1 hora. C) Cimografia mostrando o comportamento do lamelipódio durante 1 hora.

Figura 13: Hiperglicemia não altera a velocidade de formação de protrusões, mas aumenta o número de eventos improdutivos. Fibroblastos dérmicos de ratos controle e diabéticos tratados ou não com vitamina C e E foram acompanhados durante 30 min, migrando sobre fibronectina. Foram observados o número de protrusões (A), a porcentagem de retração das protrusões (B) e a velocidade de formação das mesmas (C).

4.8 Diabetes não altera o número de células aderidas, mas altera a área de espraio celular sobre colágeno e fibronectina

Com o objetivo de investigar alguns efeitos da hiperglicemia sobre as interações da célula com a matriz, a adesão das células ao colágeno e à fibronectina foram avaliadas em 20 e 60 minutos após as células serem semeadas. Em ambos os períodos, a hiperglicemia não mudou o número de células aderidas no colágeno (Figuras 14A e 14B) ou fibronectina (Figuras 15A e 15B). O antioxidante N-acetilcisteína (NAC) também não afetou a adesão celular.

O espraio, medido pela área ocupada por cada célula, foi diferentemente afetado, dependendo da matriz estudada. Como esperado, o espraio sobre colágeno aumentou ao longo do tempo (Figuras 16A e 16B). A hiperglicemia reduziu discretamente a área aderida no colágeno em 20 minutos ($1613 \pm 249.6 \mu\text{m}^2$ vs. $870.8 \pm 177.1 \mu\text{m}^{2*}$, média $\pm$ EPM) e 60 minutos ($3535 \pm 111.4 \mu\text{m}^2$ vs. $3019 \pm 197.3 \mu\text{m}^{2*}$, média $\pm$ EPM) (Figura 16). O NAC aumentou o espraio em 20 minutos ($1613 \pm 249.6 \mu\text{m}^2$ vs. $2241 \pm 56.80 \mu\text{m}^{2*}$, média $\pm$ EPM, Figura 16A) e em 60 minutos. O efeito de NAC, mesmo que discreto, foi por si só suficiente para corrigir os efeitos da hiperglicemia no espraio sobre colágeno.

Resultados semelhantes foram observados sobre fibronectina após 20 minutos (Figura 17A). Sob as condições empregadas, o espraio sobre fibronectina foi menos pronunciado do que sobre colágeno e não aumentou significativamente com o tempo. Após 1 hora, no entanto, células hiperglicêmicas apresentavam aumento do espraio, quando comparadas ao grupo controle ($870.4 \pm 69.94 \mu\text{m}^2$ vs. $1708 \pm 220 \mu\text{m}^{2**}$, média $\pm$ EPM, Figura 17B), enquanto o NAC não apresentou nenhum efeito.

Considerando que o espraio aumentado das células diabéticas sobre fibronectina poderia representar uma perda de polaridade celular, avaliamos o índice de polaridade com 60 minutos de adesão. A maioria das células ainda estava arredondada (índice de polaridade próximo de 1,0) ou ligeiramente alongada (1.5-2.0). Não observamos diferenças entre os grupos analisados (Figura 18).

A evidênciação de F-actina confirmou as observações encontradas no ensaio de adesão. Embora não houvesse diferença no número de células aderidas, após 20 minutos ou 1 hora de adesão, tanto em colágeno como em fibronectina, as células controle iniciavam seu espraio apresentando vários filopódios e microespículas (Figura 19A, C). Já as células diabéticas, por outro lado, continuavam arredondadas, com nenhum sinal visível de

espraiamento (Figura 19B, D). Após 1 hora, a maioria das células controle mostrava vários filopódios e lamelipódios. Esse processo foi mais evidente no colágeno do que na fibronectina (Figura 20A, C). Diferentemente das células controle, especialmente na fibronectina, a maioria das células diabéticas apresenta grandes lamelipódios (Figura 20B, D).

Figura 14- Hiperglicemia não afeta o número de células aderidas no colágeno tipo I. A) Quantificação de células aderidas após 20 minutos. B) Quantificação de células aderidas após 60 minutos. Os resultados estão apresentados como porcentagem em relação ao grupo controle (média $\pm$ SEM) de 3 experimentos independentes NAC = N-acetilcisteína.

Figura 15- Hiperglicemia não afeta o número de células aderidas à fibronectina. A) Quantificação de células aderidas após 20 minutos. B) Quantificação de células aderidas após 60 minutos. Os resultados estão apresentados como porcentagem em relação ao grupo controle (média $\pm$ SEM) de 3 experimentos independentes NAC = N-acetil-cisteína.

Figura 16– Hiperglicemia reduz o espraçamento sobre o colágeno tipo I. A) Espraçamento celular (medido pela área ocupada pela célula) após 20 minutos. B) Espraçamento celular após 60 minutos. Dados estão apresentados em média $\pm$ EPM de 3 experimentos diferentes. NAC = N-acetil-cisteína. (a) Diferente do controle; (b) diferente do diabético; (c) diferente do controle + NAC. * $p < 0.05$, de acordo com *One-way ANOVA*.

Figura 17 – Hiperglicemia afeta o espraçamento sobre a fibronectina. A) Espraçamento celular (medido pela área ocupada pela célula) após 20 minutos. B) Espraçamento celular após 60 minutos. Resultados apresentados como média $\pm$ EPM de 3 experimentos diferentes. NAC = N-acetil-cisteína. (a) diferente do controle; (c) diferente do controle + NAC. ** $p < 0.01$, de acordo com One-way ANOVA.

Figura 18- Hiperglicemia não afeta a polaridade de células aderidas em fibronectina por 1 hora.

O índice de polaridade foi calculado pela razão entre o comprimento do maior eixo do corpo celular (passando pelo centro do núcleo) e o comprimento do eixo perpendicular que o intersecta no centro no núcleo celular. Os gráficos mostram os histogramas da distribuição da polaridade dos grupos: controle (A), diabético (B), controle +NAC (C) e diabético + NAC (D).

Figura 19- Hiperglicemia atrasa o espreadimento inicial (20 minutos) no colágeno e na fibronectina. Coloração de F-actina (verde) usando Faloidina-conjugada com Alexa 488 e o núcleo (azul) foi corado com DAPI. Celúlas foram fixadas após 20 minutos de adesão no Colágeno tipo I (A, B) ou na fibronectina (C, D) Barra= 50µm.

Figura 20- Hiperglicemia atrasa o espraçamento de 1 hora no colágeno e na fibronectina.
Coloração de F-actina (verde) usando Faloidina-conjugada com Alexa 488 e o núcleo (azul) foi corado com DAPI. Celúlas foram fixadas após 60 minutos de adesão no colágeno tipo I (A, B) ou na fibronectina (C, D) Barra= 50µm.

4.9 Diabetes altera a distribuição das subunidades de integrinas $\alpha 5$, αv e $\alpha 1$

As integrinas que fibroblastos prioritariamente utilizam para ligar-se à fibronectina são $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, e $\alpha v\beta 3$. Utilizando imunocitoquímica, observou-se que em fibroblastos controle a subunidade $\alpha 5$ está presente em adesões focais maduras encontradas na região da lamela do corpo celular (seta) (Figura 21A, B e C), já em fibroblastos diabéticos observou-se que essa subunidade apresentava distribuição alterada, apresentando-se mais distribuída pelo corpo celular (Figura 21D). A marcação para essa subunidade também mostrou que as adesões fibrilares formadas com fibras de estresse encontravam-se menores nas células diabéticas (cabeça de seta) (Figura 21F).

Nas células controle a subunidade αv estava presente em adesões imaturas, observadas na borda dos lamelipódios (Figuras 22 e 23). Já nos fibroblastos diabéticos essa marcação encontrava-se em adesões por todo o lamelipódio, mas especialmente nos lamelipódios, e em adesões recentes (Figura 22), além de ser observada em pequenos vacúolos distribuídos por todo o corpo celular (Figura 23). A subunidade αv também estava presente num *pool* citoplasmático, tanto em células controle quanto diabéticas (Figura 22 e 23).

Já sobre colágeno, fibroblastos utilizam principalmente $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 1\beta 1$ para aderir ao substrato. Observamos que a subunidade $\alpha 1$, frequentemente observada nas adesões focais, apresentou-se em um *pool* citoplasmático em ambos os grupos. Mesmo assim observou-se, nos fibroblastos diabéticos, uma diminuição dessa subunidade (Figura 24).

Figura 21- Hiperglicemia altera a distribuição da subunidade $\alpha 5$. Imunocitoquímica mostra a distribuição da subunidade $\alpha 5$ em fibroblastos controle e diabéticos. Coloração de F-actina (vermelho) usando faloidina conjugada com rodamina e subunidade $\alpha 5$ (verde). Observar que a marcação em células controle está localizada principalmente em adesões maduras (mais alongadas), associada com fibras de estresse (seta), na região da lamela da célula. Células diabéticas mostram uma marcação mais difusa e em pequenas adesões (cabeça de seta) distribuídas por todo o corpo celular. A-C (controle) D-F (Diabético) Barra= 20 μ m.

Figura 22- Hiperglicemia altera a distribuição da subunidade αv . Imunocitoquímica mostra a distribuição da subunidade αv em fibroblastos controle e diabéticos. Coloração de F-actina (vermelho) usando faloidina conjugada com rodamina e subunidade αv (verde). Observar que a marcação em células controle (A-D) está localizada principalmente em adesões e é mais discreta que nas células diabéticas (E-H). Células diabéticas mostram uma maior marcação em lamelipódios, nas adesões imaturas. Barra= 20 μ m.

Figura 23- Hiperglicemia altera a distribuição da subunidade $\alpha 5$. Imunocitoquímica mostra a distribuição da subunidade $\alpha 5$ em fibroblastos controle e diabéticos derivados de ratos. Observar que a marcação em células controle está localizada em adesões nascentes localizadas na borda da célula (cabeças de seta). Células diabéticas mostram uma marcação mais difusa e em pequenas vesículas distribuídas por todo o corpo celular (seta). Objetiva 63x.

Figura 24- Hiperglicemia altera a distribuição da subunidade $\alpha 1$. Imunocitoquímica mostra a distribuição da subunidade $\alpha 1$ em fibroblastos controle e diabéticos derivados de ratos. Coloração para F-actina (vermelho) usando Faloidina conjugada com rodamina e subunidade $\alpha 1$ (verde). Observa-se uma diminuição desta subunidade em fibroblastos controle quando comparados aos diabéticos. A-C (controle) D-F (Diabetico). Barra= 20 μ m.

5 DISCUSSÃO

Os efeitos da hiperglicemia têm sido estudados *in vivo* e *in vitro* em diversos sistemas, tecidos e órgãos acometidos por complicações secundárias do diabetes, como p.ex. sistema nervoso, sistema cardiovascular (inclusive microvasculatura), retina e rins. Diversos estudos também têm procurado esclarecer aspectos relacionados à deficiência de cicatrização observada em diabéticos, que ocasiona feridas crônicas de difícil resolução. Sabe-se que esta deficiência tem causa multifatorial, sendo agravada por microangiopatia e neuropatia. No entanto, o papel da hiperglicemia crônica e consequente estresse oxidativo sobre a função de fibroblastos, células tão relevantes na fisiologia do tecido conjuntivo, tem sido pouco abordado.

Estudos prévios deste laboratório mostraram que a hiperglicemia afeta negativamente a migração de células epiteliais e fibroblastos de diferentes linhagens sobre fibronectina, reduzindo a sua velocidade e direcionalidade (Lamers, 2008). Este efeito foi acompanhado de um aumento da frequência de protrusões não produtivas e de uma nítida redução na estabilidade e persistência destas protrusões, provavelmente ocasionada por uma deficiência na maturação das adesões junto à matriz extracelular. Foi observada também uma redução da polaridade celular e um aumento da atividade da GTPase Rac1, principal responsável pela formação de lamelipódios, o que fornece uma base mecânica para o fenótipo promovido pela hiperglicemia. Posteriormente, observou-se que muitos destes efeitos podiam ser revertidos com a utilização de antioxidantes, como p.ex. a N-acetilcisteína (NAC). O amadurecimento das adesões depende da atividade de miosina II, regulada pela GTPase RhoA.

O presente estudo fornece novas e complementares hipóteses sobre os efeitos da hiperglicemia sobre a migração de células aderentes, o que pode contribuir para a melhor compreensão das dificuldades de cicatrização frequentemente observadas em pacientes diabéticos e para o desenvolvimento de terapias que possam atenuar este problema.

Inicialmente demonstramos que fibroblastos dérmicos de ratos diabéticos captam e metabolizam mais glicose, provavelmente pela via aeróbica. Houve um aumento na expressão gênica e protéica do transportador de glicose GLUT1, assim como na atividade de enzimas importantes da via glicolítica. A também observada mudança ultra-estrutural do fibroblasto diabético, que apresentou aumento do volume ocupado pelo retículo endoplasmático rugoso e aumento do número de mitocôndrias, pode estar relacionada com a alta atividade metabólica dessas células. Este resultado é relevante, porque a capacidade de regulação do influxo de

glicose pode determinar a susceptibilidade de um determinado tipo celular à hiperglicemia. Por exemplo, células mesangiais, muito afetadas no diabetes de longo prazo, não conseguem reduzir a entrada de glicose e sofrem os danos da hiperglicemia; diversos outros tipos celulares, menos susceptíveis, reduzem a expressão proteica do transportador de glicose GLUT1 e captam, portanto, menos glicose (Brownlee, 2001).

Observamos também uma alteração no citoesqueleto de actina em fibroblastos diabéticos, principalmente a maior frequência de um prolongamento na parte posterior da célula, formando uma “cauda”, sugestiva de deficiência contrátil (miosina II). Com relação ao comportamento migratório de fibroblastos, confirmamos resultados prévios que mostravam inibição da velocidade celular, maior número e instabilidade das protrusões celulares sobre fibronectina. Adicionalmente, demonstramos que efeitos semelhantes foram observados sobre colágeno I, uma proteína de matriz muito abundante na derme. A migração sobre fibronectina foi ligeiramente mais lenta que aquela observada sobre o colágeno em substratos 2-D, e os efeitos do diabetes foram também mais acentuados. Não podemos determinar o quanto estas diferenças estão relacionadas às condições específicas deste estudo; estudos mais detalhados utilizando outras concentrações seriam necessários para esclarecer este aspecto.

Em um gel 3-D de colágeno I contendo fibronectina as células migraram muito mais rapidamente que nos sistemas 2-D utilizados (2,6 x mais que no colágeno e 4x mais que em fibronectina), e a redução de migração promovida pelo diabetes foi acentuada, semelhante à observada sobre fibronectina. A migração 3-D em colágeno puro foi bem mais lenta (resultados não apresentados). Neste sentido, Brekman & Neufeld (2009) já haviam mostrado que a migração de células tumorais inavasivas melhorava com a adição de fibronectina a um gel de colágeno. Outros estudos mostraram que a adesão de células ao colágeno em matriz mista ocorre devido à presença da fibronectina (Grinnell and Bennett, 1981; Yamada and Olden, 1981). Mesmo quando a fibronectina não é adicionada, *in vitro* as células tentam adaptar-se para remodelar o microambiente e realizar uma melhor adesão, espraiamento e consequentemente migração (Haung et al., 2010). Esta função é executada, em parte, pela produção de diversas proteínas de matriz extracelular, principalmente de fibronectina (Grinnell and Feld, 1982; Bagambisa et al., 1994; Chou et al., 1995). Interessantemente, em substratos 2-D a hiperglicemia não afetou a direcionalidade celular, estimada pelo índice D/T (razão entre a menor distância entre as posições inicial e final da célula e a distância percorrida pela mesma). Este índice é importante porque células direcionais são mais eficientes. Observamos uma menor direcionalidade das células em substratos 3-D que em 2-D, naturalmente devida à resistência física e heterogeneidade oferecida pela matriz 3-D; as

células mudam de direção em busca das vias de menor resistência. O diabetes afetou a direcionalidade das células em matriz 3-D, tornando ainda pior a resultante da migração celular. É possível que, *in vivo*, a deficiência migratória do fibroblasto seja bastante pronunciada pela associação destes dois fatores: velocidade e direcionalidade; quanto aos mecanismos pelos quais essas células remodelam o seu microambiente, ainda não são completamente conhecidos (Martin-Martin et al., 2011).

Durante a cicatrização de feridas, fibroblastos são ativados e recrutados para o sítio de lesão para reparar o dano tecidual através do remodelamento da matriz (Grinnel, 1994). Sabe-se que, durante os diferentes estágios do remodelamento tecidual, fibroblastos expressam componentes solúveis ou ligantes de membrana, como receptores de colágeno, fatores de crescimento, proteínas da matriz extracelular e MMPs (Finlay et al., 2000; Ignatz e Massague, 1986; Ravanti e Kahari, 2000). Metaloproteinases têm papel importante em feridas (Ravanti e Kahari, 2000; Sternlicht e Werb, 2001; Wong et al., 2002), e em situações de normoglicemia há uma associação entre diminuição de atividade de MMPs, prejuízo da cicatrização e do remodelamento da matriz (Romer et al., 1996; Bullard et al., 1999; Page-McCaw et al., 2007). As MMPs aparentemente aumentam a contração das feridas por processo não esclarecido, e sua modulação auxilia na modulação do processo cicatricial (Daniels et al., 2003; Wong et al., 2005). Embora inibidores de MMPs não afetem a força contrátil gerada pelo fibroblasto (Phillips et al., 2003), sabe-se que eles afetam o fenótipo e a dinâmica celular (Sabeh et al., 2004; Wolf et al., 2003). Segundo Friedl e Bocker (2000), a migração associada ao remodelamento da matriz pode representar uma estratégia comum empregada pelas células para vencer dificuldades de natureza biofísica de resistência da matriz para poder prosseguir na migração. Neste estudo utilizamos a inibição parcial da atividade de MMPs (utilizando um inibidor de amplo espectro) na tentativa de evidenciar diferenças na resposta de células controle e diabéticas. Os resultados mostram que, independentemente da atividade de MMPs estar alterada ou não em células diabéticas, este não é um mecanismo-chave na migração deficiente destas células.

Estudos mostrando a deficiência na migração de fibroblastos diabéticos são escassos na literatura, e pouco mecanísticos. Lerman et al. (2003), utilizando ensaio de haptotaxia em câmara de Boyden e ensaio de migração fagocinética, mostraram que a migração espontânea e estimulada por hipóxia de fibroblastos derivados de camundongos diabéticos (db/db) diminuiu em comparação aos fibroblastos controle, em colágeno tipo I ou fibronectina. Nesse estudo, os efeitos da hiperglicemia foram mais pronunciados no colágeno do que na fibronectina em ambos os ensaios, embora células diabéticas secretassem mais MMP-9. Utilizando a mesma

concentração de colágeno que utilizamos em 2-D (10µg/ml), eles observaram o mesmo nível de inibição (30-40%); para fibronectina, no entanto, eles utilizaram uma quantidade 20x maior e observaram apenas uma inibição de 20%. Em nosso estudo, os efeitos da hiperglicemia foram tão pronunciados em gel 3-D contendo colágeno e fibronectina quanto em fibronectina 2-D, sugerindo que a interação celular com a fibronectina pode ser diferentemente afetada pela alta concentração de glicose.

De maneira muito interessante, todas as alterações observadas no comportamento migratório dos fibroblastos diabéticos foram prevenidas quando os animais diabéticos foram tratados desde o início da doença com as vitaminas anti-oxidantes C e E, embora parâmetros como glicemia, glicosúria, variação de peso e ingesta alimentar não tenham sido afetados por este tratamento. Este resultado sugere que um papel preponderante do estresse oxidativo, porque nestas condições a formação de AGEs e consequente glicação ainda ocorre. A maneira como o estresse oxidativo prejudica a migração, no entanto, ainda não está esclarecida.

A glicose intracelular é metabolizada por uma série de reações enzimáticas, sendo que este mecanismo é otimizado pela presença de oxigênio e pelo transporte de elétrons, que fornece energia para a geração de ATP. O aumento na captação de glicose pelas células mesangiais renais, p.ex., leva a diversas alterações metabólicas, onde o passo fundamental é a geração de EROs (Brownlee, 2001; Lee et al, 2007; Forbes et al, 2008; Paravicini e Touyz, 2008). A geração de EROS na protrusão de células endoteliais, pela atividade do complexo NADPHoxidase, efetora de Rac1, poderia diretamente oxidar resíduos cisteína de proteínas redox-sensitivas controladoras do citoesqueleto, incluindo moléculas sinalizadoras que podem modular a ativação de GTPases, como Rac1 (num feedback positivo) ou RhoA (Wu et al, 2005; Nimnual et al, 2003). Por outro lado, um quadro prolongado de estresse oxidativo pode afetar estas proteínas de forma diferente, devido à oxidação excessiva (Chiarugi e Buricchi, 2007).

Analisando os eventos que compõem a migração celular, observamos que a hiperglicemia não influenciou a velocidade de formação das protrusões, o que sugere um correto funcionamento da maquinaria de polimerização de actina. A estabilidade das protrusões, no entanto, foi negativamente afetada tanto em colágeno como em fibronectina, o que sugere o comprometimento de um mecanismo não específico relacionado à adesão, como p. ex. a atividade de miosina II. Já havíamos observado previamente que células epiteliais (CHO-K1) expostas a uma alta concentração de glicose apresentam redução de 40% na

maturação de adesões em fibronectina, de forma dependente do estresse oxidativo (Lamers, 2008).

Baseados nesses resultados, decidimos avaliar a adesão celular inicial sobre o colágeno e fibronectina (20 e 60 minutos após o plaqueamento). A hiperglicemia não afetou o número de células aderidas, mas alterou o espreadimento celular de maneira diferente, dependendo da matriz. O espreadimento das células diabéticas foi ligeiramente reduzido no colágeno e na fibronectina em 20 minutos. A mesma observação foi verdadeira para as células sobre colágeno em 60 minutos; sobre a fibronectina, no entanto, essas células encontravam-se mais espalhadas que as células controle. Esses resultados sugerem que componentes específicos dos complexos adesivos podem também estar comprometidos no diabetes. Loots et al. (1999) mostraram previamente que fibroblastos obtidos de feridas crônicas de pacientes diabéticos apresentavam-se mais espalhados e arredondados, compatíveis com maior espreadimento. Nós observamos previamente uma redução da polaridade celular, mas em células semeadas há mais de 24 horas (Lamers, 2008). Neste estudo não observamos alteração significativa na polaridade, talvez pelo período precoce (20 e 60 minutos).

Uma explicação plausível para esses resultados é que a alta concentração de glicose pode alterar a expressão ou distribuição de integrinas específicas. Sabe-se que a interação de fibroblastos com o colágeno é principalmente mediada pela integrina $\alpha 2\beta 1$, embora outros receptores como $\alpha 1\beta 1$ possam também participar. A interação de fibroblastos com fibronectina e proteínas similares, por outro lado, pode ser mediada pelas integrinas $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$, dentre outras (Wiesner et al., 2005). Em nosso estudo, utilizando imunocitoquímica, observamos que a distribuição e expressão das subunidades $\alpha 5$, αv e $\alpha 1$ estava alterada nos fibroblastos diabéticos, comparados com seus controles. A redução no tamanho das adesões maduras contendo $\alpha 5$ e o aumento de αv em adesões imaturas nos lamelipódios confirma a hipótese anterior de que a maturação das adesões está comprometida. A menor interação com colágeno, por outro lado, seria justificada pela aparente redução de $\alpha 1$. Kitsiou et al. (2003) mostraram que em células epiteliais humanas cultivadas em alta concentração de glicose a expressão das subunidades de integrinas $\alpha 3$, $\alpha 2$ and $\beta 1$ estava reduzida, enquanto que a expressão de integrinas contendo $\alpha 5$ e a integrina $\alpha v\beta 3$ aumentaram. Esse estudo pode explicar por que células diabéticas espalham menos no colágeno e mais na fibronectina.

Células diabéticas semeadas sobre colágeno ou fibronectina (20 minutos) espalharam ligeiramente melhor na presença do antioxidante NAC, que também melhora o espreadimento de células controle. Sabe-se que uma produção excessiva de EROs que supere a capacidade anti-oxidante da célula induz à oxidação inespecífica de macromoléculas, alterando a

expressão gênica e várias vias de sinalização. Estudos recentes têm mostrado, no entanto, que a geração de pequenas quantidades de ROS por várias fontes está especificamente envolvida na regulação da sinalização em diferentes funções celulares, incluindo a adesão e migração (Terada, 2006; Chiarugi e Buricchi, 2007).

Investigando a questão da maturação deficiente de adesões e “caudas” mais alongadas em células diabéticas, decidimos avaliar a participação da miosina II na migração destas células. Sabe-se que Rho cinase (ROCK) é um efetor da GTPase Rho que regula a formação das fibras de estresse e participa da retração traseira das células. O inibidor específico de ROCK, Y-27632, impede a formação das fibras de estresse, reduz a contratilidade e inviabiliza a reorganização da matriz em culturas 3-D (Kim et al., 2006 e Lee et al., 2009). Em células tumorais mamárias, a interação com o colágeno 3-D e invasão dependem de ROCK (Provenzano et al., 2008). Em nosso estudo, observamos que a inibição de ROCK reduziu a velocidade de migração de células controle tanto quanto o diabetes. Adicionalmente, houve uma alteração morfológica significativa, já descrita previamente por outros autores (Friedl e Wolf, 2009; Zhou e Petroll, 2010). Curiosamente, houve inibição adicional da migração de células diabéticas, mas de apenas 23%. A migração de células controle com inibição de ROCK, diabéticas e diabéticas com inibição de ROCK foi muito semelhante, sugerindo que um comprometimento da atividade de miosina II pode ser um mecanismo essencial envolvido na deficiência de migração de fibroblastos diabéticos.

6 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a hiperglicemia e consequente estresse oxidativo reduzem a migração de fibroblastos dérmicos em substratos de diferentes composições (fibronectina, colágeno I) e dimensionalidades, e que essa deficiência é mais pronunciada na presença de fibronectina. Alterações na adesão ao colágeno e fibronectina relacionadas a alterações na composição dos complexos adesivos (distribuição de integrinas contendo subunidades $\alpha 1$, $\alpha 5$ e αv) e na sua maturação, podendo resultar em alterações na sinalização e organização do citoesqueleto, podem ser a base para entender a deficiência da migração celular em diabéticos. Adicionalmente, uma menor atividade de miosina II, regulada pela GTPase Rho, em células diabéticas, parece contribuir para a migração deficiente, especialmente em ambiente 3-D.

REFERÊNCIAS *

- Bagambisa FB, Kappert HF, Schilli W. Cellular and molecular biological events at the implant interface. *J Cranio Maxill Surg.* 1994;22:12-7.
- Baumgartner-Pazer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A, Waldhausl W. High-glucose triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes.* 1995;44:1323-7.
- Bavaresco CS, Calcagnotto T, Tagliari B, Delwing D, Lamers ML, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT. Brain Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase inhibition induced by arginine administration is prevented by vitamins E and C. *Neurochem Res.* 2003;28(6):825-9.
- Brekhman V, Neufeld G. 2009. A novel asymmetric 3-D in vitro assay for the study of tumor cell invasion. *BMC Cancer.* 2009;9:415.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414:813-20.
- Brownlee M. The pathology of Diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes.* 2005; 54:1615-25.
- Bullard KM, Lund L, Mudgett JS, Mellin TN, Hunt TK, Murphy B, Ronan J, Werb Z, Banda MJ. Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Ann Surg.* 1999;230:260–5.
- Chiarugi P, Buricchi F. Protein tyrosine phosphorylation and reversible oxidation: two cross-talking posttranslation modifications. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:1-24.
- Chou LS, Firth JD, Uitto VJ, Brunette DM. Substratum surface-topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. *J Cell Sci.* 1995;108:1563-73.
- Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(5):633-9.
- Czuchra A, Wu X, Meyer H, van Hengel J, Schroeder T, Geffers R., Rottner K, Brakebusch C. Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. *Mol Biol Cell.* 2005;16:4473-84.
- Daniels, JT, Cambrey AD, Occleston NL, Garrett Q, Tarnuzzer RW, Schultz GS, Khaw PT. Matrix metalloproteinase inhibition modulates fibroblast mediated matrix contraction and collagen production in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:1104-10.

DeMali KA, Wennerberg K, Burridge K. Integrin signaling to the actin cytoskeleton *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15:572-82.

Deveci M, Gilmont RR, Dunham WR, Mudge BP, Smith DJ, Marcelo CL. Glutathione enhances fibroblasts collagen contraction and protects keratinocytes from apoptosis in hyperglycaemic culture. *British J Dermatol.* 2005;152: 217-224.

Doxey DL, Ng MC, Dill RE, Lacopino AM. Platelet-derived growth factor levels in wounds of diabetic rats. *Life Sci.* 1995; 57 (11):1111-1123.

Even-Ram S, Yamada KM. Cell migration in 3-D matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17: 524-32.

Ferreira FD, Nicoalu J. Changes in glucose metabolism in submandibular salivary glands of rats after isoproterenol or incisor-tooth amputation. *Arch Oral Biol.* 1987;32(7):499-503.

Finlay GA, Thannickal VJ, Fanburg BL, Paulson KE. Transforming growth factor-beta 1-induced activation of the ERK pathway/activator protein-1 in human lung fibroblasts requires the autocrine induction of basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem.* 2000;275:27650-6.

Forbes JM, Cooper ME, Oldfield MD, Thomas MC. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes.* 2008;57:1446-54.

Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol.* 2009;1:1.

Goodson WH, Hunt TK. Studies of wound healing in experimental diabetes mellitus. *J Surg Res.* 1977;22:221-7.

Griffith LG, Schwartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:211-24.

Grinnell F, Bennett MH. Fibroblast adhesion on collagen substrata in the presence and absence of plasma fibronectin. *J Cell Sci.* 1981;48:19-34.

Grinnell F, Feld MK. 1981. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody-binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J Biol Chem.* 1982;257:4888-93.

Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol.* 2003; 13(5):264-9.

Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol.* 1994; 124:401-4.

Ha H, Lee HB. Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney. *Nephrology (Carlton).* 2005;10(Suppl):S7-10.

Ha H, Lee HB. Reactive oxygen species and matrix remodeling in diabetic kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:S246-S9

Halliwell B: Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nutr*. 1996;16:33-50

Heath & Peachey. Morphology of fibroblasts in collagen gels: a study using 400 keV electron microscopy and computer graphics. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1989;14:382-92.

Hehenberger K, Heilborn JD, Brismar K, Hansson A. Inhibited proliferation of fibroblast derived from chronic diabetic wounds and normal dermal fibroblasts treated with high glucose is associated with increase formation of l-lactose. *Wound Repair Regen*. 1998;6:135-141.

Herbrand U, Ahmadian MR. p190-RhoGAP as an integral component of the Tiam1/Rac1-induced downregulation of Rho. *Biol Chem*. 2006;387:311-7.

Hinz B, Alt W, Johnen C, Herzog V, Kaiser HW. Quantifying lamella dynamics of cultures cells by SACED, a new computer assisted motion analysis. *Exp Cell Res*. 1999;251:234-43.

Hordijk PL. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res*. 2006;98:453-62.

Horwitz R, Webb D. Cell migration. *Curr Biol*. 2003;13:756-9.

Huang CJ, Tseng PY, Chang YC. Effects of extracellular matrix protein functionalized fluid membrane on cell adhesion and matrix remodeling. *Biomaterials*. 2010;31:7183 – 95.

Humphries MJ, Travis MA, Clark K, Mould AP. Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins *Biochem Soc Trans*. 2004;32(5):822-5.

Hynes RO. The dynamic dialogue between cells and matrices: implications of fibronectin's elasticity. *PNAS*. 1999;16:96(6):2588-90.

Hynes RO. Structural biology: changing partners. *Science*. 2003;300(5620):755-6.

Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 1986;261:4337-45.

Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A: Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol*. 2005;4:5.

Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1967;126:201-5.

Kim A, Lakshman N, Petroll WM. Quantitative assessment of local collagen matrix remodeling in 3-D culture: the role of Rho kinase. *Exp Cell Res*. 2006;312:3683–92.

Kitsiou PV, Tzinia AK, Stetler-Stevenson GW, Michael AF, Fan W-W, Zhou B, Tsilibary EC. Glucose-induced changes in integrins and matrix-related functions in culture human glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;284:671-9.

Lamers ML, Almeida MES, Vicent-Manzanares M, Horwitz AF, Santos MF. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. *Plon One*. 2011. In press.

Lamers ML. Concentração elevada de glucose e interação célula-matriz extracelular: efeitos sobre a homeostase de glândulas salivares, adesão e migração celular. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Lammermann T, Bader BL, Monkley SJ, Worbs T, Wedlich-Soldner R, Hirsch K, et al. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*. 2008;435:51-5.

Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J*. 1999;13(1):23-30.

Lee HB, Seo JY, Yu MR, Uh ST, Ha H. Radical approach to diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2007; (Suppl.)S67-70.

Lee HB, Yu M, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:S241-5.

Lee MA, Palace J, Stabler G, Ford J, Gearing A, Miller K. Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A longitudinal clinica and MRI study. *Brain*. 1999;122(Pt 2),191–7.

Lee PF, Yeh AT, Bayless KJ. Nonlinear optical microscopy reveals invading endothelial cells anisotropically alter three-dimensional collagen matrices. *Exp Cell Res*. 2009;315:396–410.

Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, Levine JP, Gurtner GC. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration,vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am J Pathol*. 2003;162:303-12.

Lluís JM, Buricchi F, Chiarugi P, Morales A, Fernandez-Checa JC. Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: activation of nuclear factor- κ B via c-SRC and oxidant-dependent cell death. *Cancer Res*. 2007;67(15):7368-77.

Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*. 2000;79:144-152.

Loots MA, Kenter SB, Au FL, van Galen WJ, Middelkoop E, Bos JD. et al. Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur J Cell Biol.* 2002;81:153-60.

Loots MA, Lamme EN, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation. *Arch Dermatol Res.* 1999;291:93-9.

Lopes JP, Oliveira SM, Fortunato JS. Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células β -pancreáticas relação com as complicações da diabetes *mellitus* tipo 2. *Acta Med Port.* 2008;21:293-302.

Marques MR, Hajjar D, Franchini KG, Moriscot AS, Santos MF. Mandibular appliance modulates condylar growth through integrins. *J Dent Res.* 2008;87(2):153-8.

Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997;276:75.

Martin-Martin B, Tovella V, Dahlmann-Noorb AH, Khawb PT, Bailly M. The effect of MMP inhibitor GM6001 on early fibroblast-mediated collagen matrix contraction is correlated to a decrease in cell protrusive activity. *European Journal of Cell Biology.* 2011;90:26–36.

Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(5):1358-73.

Mehlen P, Schulze-Osthoff, Arrigo A. Small stress protein as novel regulators of apoptoses. *J Biol Chem.* 1996;271:16510-4.

Muller M, Trocme C, Lardy B, Morel F, Halimi S, Benhamou PY. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet. Med.* 2008;25:419-26.

Nimnual AS, Taylor LJ, Bar-Sagi D. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol.* 2003;5:236-41

Nobes, CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol.* 1999;22:1235-44.

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:221–33.

Pankov R, Endo Y, Even-Ram S, Araki M, Clark K, Cukierman E. et al. A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J Cell Biol.* 2005;170:793-80.

Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008;31:S170-80.

Phillips JA, Vacanti CA, Bonassar LJ. Fibroblasts regulate contractile force independent of MMP activity in 3D-collagen. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;312:725–32.

Pirila E, Korpi JT, Korkiamaki T, Jahkola T, Gutierrez-Fernandez A, Lopez Otin C, Saarialho-Kere U, Salo T, Sorsa T. Collagenase-2 (MMP-8) and matrilysin-2 (MMP-26) expression in human wounds of different etiologies. *Wound Rep Reg*. 2007;15:47-57.

Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Trier SM, Keely PJ. Contact guidance mediated threedimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophys J*. 2008;95:5374–84.

Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE. et al. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature*. 2005;436:123-7.

Ravanti L, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int J Mol Med*. 2000;6:391–407.

Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 1992;70:401-10.

Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann 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*. 1992;70:389-99.

Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:446.

Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;15:167-78.

Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, Dano K. Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat Med*. 1996;2:287–92.

Rösen P, Nawroth PP, King G, Möller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2001;17:189-212

Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M, et al. *J Cell Biol* 2004;167(4):769-81.

Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway, P, Balbin M, Lopez-Otin, C, Shapiro S, Inada M, Krane S, et al. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol*. 2004;167, 769–81.

Sander EE & Collar JG. Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer*. 1999;35:1905-11.

Scheepers A, Joost HG, Schürmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2004;28(5):364-71

Shaw JE, Boulton AJ. The pathogenesis of diabetic foot problems: an overview. *Diabetes*. 1997;46(2):58-61.

Sprovchicov N, Sizyakov G, Gartsbein M, Accili D, Tennenbraum T, Wertheimer E. Glucose effects on skin keratinocytes. *Diabetes*. 2001;50:1627-35.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463–516.

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. 2001;81:153-208.

Tanaka E, Ase K, Okuda T, Okumura N, Nogimori K. Mechanism of acceleration of wound healing by basic fibroblast growth factor in genetically diabetic mice. *Biol Pharm Bull*. 1996;19:1141-8.

Tsilibary EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. *J Pathol*. 2003;200(4):537-46.

Vaalamo M, Mattila L, Johansson N, Kariniemi AL, Karjalainen-Lindsberg ML, Kahari VM, Saarialho-Kere U. Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. *J Invest Dermatol*. 1997;109:96-101.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell*. 2007;39(1):44-84

Vecchione C, Aretini A, Marino G, Bettarini U, Poulet R, Maffei A et al. Selective Rac-1 inhibition protects from diabetes-induced vascular injury. *Circ Res*. 2006;98:218-25.

Werner S, Breiden M, Hubner G, Greenhalg DG, Longaker MT. Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Invest Dermatol*. 1994;103:469-473.

Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JF. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*. 1988;175:231-7.

Wiesner S, Legate KR, Fassler R. Integrin-actin interactions. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005; 62:1081-99.

Williams RH. Textbook of Endocrinology. 8th ed. Section 7, Fuel homeostasis New York: Saunders.

Wolf K, Alexander S, Schacht V, Coussens LM, von Andrian UH, van Rheenen J, Deryugina E, Friedl P. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. *Semin Cell Dev Biol.* 2009; 20(8): 931-41.

Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bocker EB, Friedl P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol.* 2003;160:267–77.

Wong TT, Mead AL, Khaw PT. Prolonged antiscarring effects of ilomastat and MM after experimental glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:2018–22.

Wong TT, Sethi C, Daniels JT, Limb GA, Murphy G, Khaw PT. Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment. *Surv Ophthalmol.* 2002;47:239–56.

World Health Organization. 2011. Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en. [2011, Jun 16].

Yamada KM, Olden K. Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature.* 1981; 275:179-84.

Zhou C, Petroll WM. Rho Kinase Regulation of Fibroblast Migratory Mechanics in Fibrillar Collagen Matrices. *Cell Mol Bioeng.* 2010;13(1):76–83.