MARIANA MARIN MONTEIRO

**EFEITOS DA ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SOBRE
FIBROBLASTOS PERIODONTAIS HUMANOS – POTENCIAL REGULAÇÃO
POR MICRORNAS 221 e 222**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção
de título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos
Versão Original

SÃO PAULO

2017

RESUMO

MONTEIRO, M. M. **Efeitos da elevada concentração de glicose sobre fibroblastos periodontais humanos - potencial regulação por microRNAs 221 e 222**. 2017. 95 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da glicose elevada sobre células do ligamento periodontal humano, e esclarecer o papel de microRNAs (miRNAs) nas alterações observadas. As células foram obtidas de dentes pré-molares de crianças/adolescentes e divididas em grupos: controle (5 mM de glicose) e glicose elevada (30 mM de glicose), mantidos por 7 dias. A glicose reduziu a adesão celular, reduziu o espreadimento e inibiu a migração celular, com redução da velocidade e direcionalidade. A glicose não alterou a proliferação celular, mas aumentou a morte por apoptose e a expressão de caspase 3. A expressão de miRNAs 29a e 29ax não foi modulada pela glicose, enquanto a de miRNAs 221 e 222 mostrou-se reduzida. A inibição de miR-221 e miR-222 reduziu a migração e aumentou a morte celular, enquanto a superexpressão destes dois miRs aumentou a migração celular e reduziu a morte por apoptose. Em conclusão, células do ligamento periodontal humano são sensíveis à elevada concentração de glicose em funções como migração e sobrevivência.

ABSTRACT

MONTEIRO, M. M. **Effects of high glucose on human fibroblasts from periodontal ligament – potencial regulation by microRNAs 221 and 222.** 2017. 95 p. Ph.D. thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The objective of this study was to evaluate the effects of high glucose on human periodontal ligament cells, and to clarify the role of microRNAs (miRNAs) in these effects. The cells were obtained from children / adolescents premolar teeth and divided into groups: control (5 mM glucose) and high glucose (30 mM glucose), maintained for 7 days. Glucose reduced cell adhesion, reduced spreading and inhibited cell migration, with reduced speed and directionality. Glucose did not alter cell proliferation, but increased death by apoptosis and caspase 3 expression. Expression of 29a and 29ax miRNAs was not modulated by glucose, whereas miRNAs 221 and 222 were reduced. Inhibition of miR-221 and miR-222 reduced migration and increased cell death, while overexpression of these two miRs increased cell migration and reduced death by apoptosis. In conclusion, cells of the human periodontal ligament are sensitive to high glucose concentration in functions such as migration and survival.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais sobre Diabetes Mellitus

Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS, o Diabetes Mellitus (DM) é uma desordem metabólica caracterizada por defeitos na secreção ou função da insulina, ou ambos, levando à hiperglicemia (HG) crônica e a distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), há uma epidemia de DM em curso, com uma estimativa de 387 milhões de pessoas portadoras desta desordem no mundo, podendo atingir o número de 471 milhões até 2035. A Pesquisa Nacional de Saúde – PNS estimou que, em 2013, no Brasil, 6,2% da população com 18 anos ou mais de idade referiram diagnóstico médico de DM. A SBD aponta estudos que revelam taxas de 33,7 mortes/100 mil habitantes para a população geral brasileira em 2011. A essa epidemia pode-se relacionar mudanças gradativas no estilo de vida (aumento do sedentarismo, por exemplo) e alimentação, ao longo das últimas décadas, que contribuem para o aumento da prevalência do DM em adultos de diferentes faixas etárias. O DM promove diversas complicações de longo prazo, a maioria associada à hiperglicemia crônica. Dentre as mais relevantes estão a infertilidade masculina (MASCARENHAS et al., 2012), disfunções na microvasculatura, neuropatia, retinopatia, insuficiência renal e cicatrização deficiente (BROWNLEE, 2010; DANAELI et al., 2011).

Quanto maior a captação da glicose extracelular pelas células, maior é sua susceptibilidade (Brownlee, 2001). Já foi demonstrado em células mesangiais e em alguns outros tipos celulares, por exemplo, que a HG promove aumento de fluxo na via glicolítica e na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. A atividade mitocondrial elevada gera uma maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem superar as defesas antioxidantes celulares e ocasionar um estresse oxidativo (BROWNLEE, 2001; 2010). Estas moléculas reativas afetam a atividade de enzimas da via glicolítica, particularmente da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), lentificando o fluxo na via e acumulando diferentes metabólitos nas células. Este acúmulo, por sua vez, gera um aumento no fluxo de vias paralelas à via glicolítica (figura 1), que resulta num aumento adicional do estresse oxidativo e alterações significativas da expressão gênica, devido a modificações moleculares e alteração da expressão de diferentes fatores de transcrição (BROWNLEE, 2010).

Figura 1 – Vias metabólicas intracelulares ativadas no DM.

Espécies reativas de oxigênio (O_2^-) inibem a atividade da enzima GAPDH, lentificando o fluxo na via glicolítica e ativando, devido ao acúmulo de diferentes metabólitos, o fluxo em vias paralelas como a via dos polióis, via das hexosaminas, via da proteína cinase C e formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). De maneira geral, a ativação destas vias resulta em depleção de defesas antioxidantes e aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, aumentando o estresse oxidativo. Modificado de: (BROWNLEE, 2001).

Conforme mencionado, a hiperglicemia aumenta progressivamente a glicosilação não enzimática (glicação) de proteínas, devido à formação de produtos de glicação avançada (AGEs). Estes compostos heterogêneos formam-se constantemente sob condições fisiológicas (envelhecimento, por exemplo) e patológicas e, dentre outros efeitos, estimulam a secreção de citocinas inflamatórias (BYUN et al., 2017). AGEs acumulam-se em proteínas ligando-se aos grupos amina de maneira aleatória, podendo alterar sua função. No caso de componentes da matriz extracelular (colágeno, por exemplo), este efeito é magnificado pelo fato da maioria apresentar meia-vida longa; o depósito de AGEs pode afetar, por exemplo, sítios de interação entre a matriz extracelular e as células (VOZIYAN et al., 2014). Adicionalmente, o acúmulo de AGEs promove um aumento da geração de EROs, o que pode impactar significativamente na sobrevivência e longevidade celular, levando à ativação de

caspsases e, conseqüentemente, à morte celular programada por apoptose ou autofagia (MAIESE, 2015).

Uma complicação comum do DM é a deficiência na cicatrização em pele e mucosas. Em odontologia, o DM também aumenta significativamente a incidência e velocidade de progressão da doença periodontal, condição multifatorial iniciada por infecção com bactérias patogênicas, promovida pela inflamação e resposta imunológica contra estas bactérias e modificada por diferentes fatores ambientais e genéticos. Além da doença periodontal, o DM pode influenciar a movimentação ortodôntica e a regeneração de lesões periapicais, mesmo após tratamento endodôntico. Complicando ainda mais este quadro, o DM reduz significativamente o fluxo salivar, gerando inúmeras complicações decorrentes da menor salivação: aumento de infecções oportunistas, atrofia da mucosa, aumento de cáries e de doença periodontal (GONZALEZ-SERRANO et al., 2016).

1.2 Diabetes Mellitus e Periodonto

O ligamento periodontal (LP) é um tecido conjuntivo muito celular, que contém feixes espessos de fibras colágenas que conectam dois tecidos mineralizados: o cimento que recobre a raiz do dente e a superfície cortical do osso alveolar. Contém uma variedade de populações celulares, como fibroblastos e todos os tipos celulares encontrados nos tecidos conjuntivos propriamente ditos (p. ex. macrófagos e outras células de defesa, mastócitos), osteoblastos, osteoclastos, cementoblastos, células endoteliais e células tronco/progenitoras. Além disso, é muito innervado (principalmente innervação sensorial aferente e vasomotora eferente) e vascularizado. De maneira geral, o LP exerce funções de suporte e fixação do dente no alvéolo, sensorial, de nutrição e de homeostasia do dente/periodonto (TEN CATE, 2013). Diferentemente de outros tecidos conjuntivos propriamente ditos, o LP apresenta elevado metabolismo celular e sofre remodelação de maneira bastante dinâmica (CARNEIRO; MORAES, 1965).

A origem das células indiferenciadas e fibroblastos do LP é o folículo dentário, tecido de origem ectomesenquimal derivado da crista neural, que circunda o germe dental durante o seu desenvolvimento (LUBBOCK et al., 1996; PALMER; LUMSDEN, 1987). Existe uma população celular no LP com resposta imediata a forças de tensão e tração, com uma habilidade única de levar a diferenciação celular a um estado fibroblástico ou osteogênico,

dependendo da posição que a célula ocupa no ligamento (BEERTSEN; MCCULLOCH; SODEK, 1997).

A doença periodontal é uma doença de origem infecciosa que leva à inflamação progressiva dos tecidos periodontais, gerando dano tecidual e perda gradual da inserção do dente no alvéolo. A destruição dos feixes de colágeno que inserem o dente no alvéolo em fases avançadas da doença é irreversível, gerando grande complexidade para uma potencial reconstituição terapêutica do periodonto de inserção. O aparecimento de bolsas periodontais (figura 2), espaços que surgem entre a gengiva e o dente após a destruição do ligamento periodontal e de parte do osso alveolar, impede a boa higienização pelo paciente e acelera a progressão da doença devido ao acúmulo de cálculo e bactérias na superfície radicular. Devido a este acúmulo, os tecidos periodontais não aderem ao dente e a bolsa aumenta progressivamente. Em diversos aspectos, esta condição se assemelha a uma ferida crônica que não cicatriza devido à permanência do agente agressor.

Figura 2 – Esquema de perda de inserção do dente devido à doença periodontal.

À esquerda observa-se um periodonto saudável e à direita alguns efeitos da doença periodontal, que leva à destruição do ligamento periodontal e do tecido ósseo, formação de bolsa periodontal e perda progressiva da inserção do dente. Fonte: Adaptado de (CODMED, 2016).

A terapia da doença periodontal consiste primariamente da remoção do agente agressor e preparação da superfície radicular para uma nova aderência do periodonto ao

dente, eliminando bolsas periodontais. Etapas específicas relativas à eliminação das bolsas e terapias de reconstituição dos tecidos de suporte são aplicadas de acordo com as indicações de cada caso. A remoção de bactérias e cálculo permite ao tecido periodontal promover a cicatrização, na qual a redução da reação inflamatória e a atividade dos fibroblastos são fatores essenciais.

Uma diminuição da proliferação e do número de células cultivadas a partir do LP após exposição a uma elevada concentração de glicose já foram observados (KATO et al., 2016; KIM et al., 2006). Adicionalmente, quando expostas à elevada concentração de glicose estas células podem sofrer alterações como a diminuição na expressão de proteínas de adesão à matriz extracelular (NISHIMURA et al., 1996), o que prejudicaria a migração celular e a cicatrização. Preshaw et al. (2012) demonstraram que a hiperglicemia pode alterar a inflamação local causada pela periodontite, assim como a periodontite poderia alterar os níveis de glicose no sangue. Da mesma forma, Sonnenschein e Meyle (2015) mostraram que pacientes com DM apresentaram aumento de citocinas pró-inflamatórias, o que contribui para o comprometimento do periodonto.

Conforme mencionado, o DM pode, também, prejudicar o tratamento ortodôntico, que se baseia em uma resultante de forças de tensão X tração exercidas sobre o LP, com a finalidade de movimentar os dentes na arcada dentária (figura 3). O movimento dentário é realizado através do remodelamento do osso alveolar, frente a uma ação mecânica. A reabsorção óssea é causada pela atividade de osteoclastos no lado de compressão, enquanto os osteoblastos promovem a formação óssea no lado de tensão do LP. Li et al. (2010) observaram, em ratos diabéticos, que o DM prolonga a degradação e remodelamento do LP e aumenta a reabsorção do osso alveolar frente às forças mecânicas exercidas durante tratamento ortodôntico. Aparentemente, o DM pode afetar o *turnover* ósseo, resultando em uma diminuição da densidade de minerais no osso. Braga et al. (2011) observaram que ratos diabéticos apresentaram maior movimentação ortodôntica em comparação aos ratos normoglicêmicos, muito provavelmente por haver uma redução de osteoblastos e um aumento de osteoclastos.

Figura 3 – Esquema de movimentação ortodôntica.

À esquerda no esquema, o lado esquerdo do dente mostra tração do ligamento periodontal com um alargamento do espaço onde encontra-se o LP, gerando um estímulo para a formação óssea, concomitantemente à pressão do LP no lado direito do dente, gerando um estímulo para a reabsorção óssea. Fonte: Adaptado de (BLOGGER, 2016).

Além da doença periodontal e da movimentação ortodôntica, o DM pode também prejudicar a reparação de lesões periapicais causadas por contaminação endodôntica. Nestas lesões há reabsorção do osso alveolar, formando uma cavidade que engloba o forame apical do dente (figura 4). Essa região, após tratamento endodôntico, deve se regenerar, recompondo o osso alveolar e o LP locais. Pacientes portadores de DM do tipo 2 apresentam aumento da prevalência de lesões periapicais (SEGURA-EGEA et al., 2005; SEGURA-EGEA et al., 2012), sendo observadas lesões osteolíticas de maior tamanho, maior probabilidade de infecções periapicais assintomáticas e demora de reparo periapical. Além disso, já foi demonstrado que a frequência de lesões periradiculares é maior em pacientes com DM de longo prazo, quando comparados a pacientes com curto prazo de DM (FALK; HUGOSON; THORSTENSSON, 1989; MESGARANI et al., 2014).

Figura 4 – Esquema de um dente inserido no alvéolo com lesão periapical por contaminação endodôntica.

Podemos observar um processo de cárie que se estende até a polpa. No ápice da raiz observa-se uma lesão periapical, que compromete todos os tecidos periodontais. Fonte: (DENTAZONE, 2016).

1.3 Diabetes mellitus e Cicatrização

Durante o reparo de lesões no tecido conjuntivo, a resposta inflamatória exerce um papel fundamental, assim como a angiogênese, proliferação celular, deposição e remodelação da matriz extracelular (principalmente colágenos fibrilares e fibronectina). Estes processos envolvem diferentes tipos celulares, principalmente células inflamatórias, fibroblastos, miofibroblastos (diferenciados a partir de fibroblastos, com função contrátil e pró-fibróticos) e células epiteliais (queratinócitos e células endoteliais) (MARTIN, 1997).

Os fibroblastos são células funcionalmente muito importantes em tecidos conjuntivos, sendo responsáveis pela síntese e degradação da matriz extracelular e secreção de diversos fatores de crescimento que modulam o comportamento de outros tipos celulares. Durante a cicatrização, especialmente nas fases mais tardias, os fibroblastos proliferam, migram e sintetizam uma matriz extracelular provisória, que posteriormente será substituída por uma matriz mais fibrosa e estável. A remodelação da matriz também é função dos fibroblastos (TRACY et al., 2016).

Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa mostraram um retardo na cicatrização cutânea em camundongos diabéticos associado a uma redução do número de células inflamatórias e da secreção de citocinas IL-6, IL-1 e TNF- α na fase aguda da cicatrização (PESSOA, 2014). Em estágios mais avançados da cicatrização, no entanto, os mesmos parâmetros demonstraram que a inflamação nos diabéticos foi persistente e houve retardo na reepitelização e formação de novos anexos. Os diabéticos também apresentaram maior quantidade de miofibroblastos em estágios tardios. Paralelamente, a peroxidação lipídica, um indício de maior geração de EROs, estava 2.5 x aumentada na derme de diabéticos (PESSOA et al., 2016).

A cicatrização da ferida periodontal segue os mesmos eventos da cicatrização de outras feridas; no periodonto, no entanto, diferentemente de outras regiões, as margens opostas da ferida não são vascularizadas. Estas margens compreendem uma superfície dentária rígida, mineralizada e avascular, tecido conjuntivo e epitélio do retalho gengival e, abaixo e/ou nas laterais (dependendo do formato da bolsa periodontal), ligamento periodontal hígido. A pesquisa atual concentra-se na identificação de fatores biológicos que favorecem a migração e proliferação dos tecidos periodontais (GRZESIK; NARAYANAN, 2002), principalmente de células do ligamento periodontal (fibroblastos e células indiferenciadas).

Durante o tratamento periodontal, a raspagem da superfície radicular remove cálculos e cemento contaminado, permitindo que células do ligamento migrem e povoem esta superfície para a regeneração. Como as células epiteliais do epitélio juncional, na gengiva, tendem a migrar rapidamente sobre a superfície radicular para formar um epitélio juncional longo, técnicas de regeneração guiada utilizando células cultivadas (YOSHIDA et al., 2012; ZHOU et al., 2012) e barreiras de biomateriais (XU et al., 2012) têm procurado barrar a migração do epitélio e, simultaneamente, povoar a superfície radicular com células mesenquimais. Apesar do epitélio juncional longo eliminar a bolsa periodontal, ele está longe de corresponder a uma inserção ideal do dente no alvéolo. Acelerar a migração de células do ligamento periodontal é, portanto, muito relevante na regeneração. Ademais, entender o comportamento destas células frente à glicose elevada é de extrema importância na regeneração do periodonto de diabéticos, já que estes pacientes apresentam uma maior susceptibilidade aos efeitos da doença periodontal.

1.4 Hiperglicemia e Migração de Fibroblastos

A migração de fibroblastos consiste de quatro eventos cíclicos básicos (figura 5): formação de uma protrusão na parte dianteira da célula (lamelipódio, formado graças à polimerização de actina junto à membrana celular), adesão do lamelipódio à matriz extracelular, amadurecimento das adesões, deslocamento do corpo celular para a frente e retração da parte posterior da célula (PARSONS et al., 2010). Na etapa de adesão à matriz, algumas adesões imaturas amadurecem tornando-se complexos focais e, posteriormente, adesões ou contatos focais que ancoram feixes de filamentos de actina e miosina II (fibras de estresse), servindo como pontos de ancoragem durante a migração (RIDLEY, 1999). Estas adesões contêm diversos receptores para matriz extracelular, principalmente integrinas, que são dinamicamente substituídas na medida em que a adesão amadurece. A fosforilação da cadeia leve de miosina II também é um fenômeno importante na migração, resultando no aumento da contratilidade das fibras de estresse 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, por diferentes mecanismos que envolvem proteólise e contratilidade, dentre outros (PARSONS et al., 2010; DEVREOTES; HORWITZ, 2015).

Figura 5 – Esquema de uma célula aderente migrando.

O esquema apresenta eventos importantes na migração, como a formação do lamelipódio (protrusão), adesão ao substrato de matriz extracelular (MEC) e retração da parte traseira simultaneamente à contração do corpo celular. Fonte: Adaptado de (CYTOCHEMISTRY, 2016).

Todo este ciclo depende de modificações do citoesqueleto de actina e tubulina (HORWITZ; WEBB, 2003), reguladas por proteínas de baixo peso molecular com atividade de GTPases pertencentes à família Rho (de *Ras-Homology*), uma subfamília da grande família de GTPases Ras. Estas GTPases ciclam entre um estado ativo (ligado ao GTP) e inativo (ligado ao GDP), sendo ativadas por proteínas reguladoras denominadas GEFs (*Guanine Nucleotide Exchange Factors*) e inativadas por proteínas denominadas GAPs (*GTPase Activating Proteins*, que catalisam a hidrólise de GTP). Na forma ativa, as GTPases Rho interagem com uma variedade de proteínas efetoras e exercem suas funções por intermédio destas proteínas; na forma inativa, ficam complexadas no citoplasma com uma proteína inibitória denominada GDI (*Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor*) (TAKAI; SASAKI; MATOZAKI, 2001; RIDLEY, 2013).

As Rho GTPases mais conhecidas e amplamente distribuídas são RhoA, Rac1 e Cdc42, que regulam a polimerização de actina para formação de processos celulares como fibras de estresse, lamelipódios e filopódios (prolongamentos finos de carácter exploratório, que muitas vezes precedem a formação dos lamelipódios), respectivamente. Neste contexto, uma das principais proteínas efetoras de RhoA é a Rho-cinase (ROCK), que apresenta duas isoformas: ROCK-1 e ROCK-2. Estas cinases fosforilam a cadeia leve da miosina II presente nas fibras de estresse, aumentando sua interação com a actina e, consequentemente, a contratilidade celular (RIDLEY 1999; 2013).

Além da regulação do citoesqueleto de actina e migração celular, estas GTPases também participam da regulação de microtúbulos, tráfego de vesículas, transcrição gênica, adesão celular, progressão no ciclo celular e apoptose (ASPENSTRÖM; FRANSSON; SARAS, 2004; BELMONTE et al., 2006; HALL, 2005; HUANG; HE, 2010; NOBES; HALL, 1999; PATEL et al., 2007; RIDLEY, 1999). A figura 6 mostra um fibroblasto migrando e os principais locais de atuação destas três GTPases Rho.

Figura 6 – Esquema de um fibroblasto migratório, apresentando os processos regulados pelas GTPases RhoA, Rac1 e Cdc42.

A polimerização ramificada de actina é a base do lamelipódio, regulado por Rac1; os filopódios são regulados por Cdc42, enquanto as fibras de estresse, constituídas principalmente por actina e miosina II, ancoradas em adesões focais, são reguladas por RhoA. Fonte: Adaptado de (MBINFO, 2016).

Resultados prévios de nosso grupo de pesquisa mostraram que o estresse oxidativo promovido pela glicose elevada afeta negativamente a migração de fibroblastos sobre fibronectina e colágeno tipo I, com redução da velocidade e direcionalidade celulares (ALMEIDA, 2011; LAMERS et al., 2011). Este efeito foi observado, com a mesma intensidade, tanto em células expostas por vários dias à alta concentração de glicose *in vitro*, como em células obtidas de animais diabéticos e mantidas sob elevada concentração de glicose (LAMERS et al., 2011). Este resultado é muito importante porque demonstra que, em termos de migração celular, os efeitos deletérios do DM sobre fibroblastos podem ser reproduzidos *in vitro* pela exposição das células à glicose elevada. Observou-se também um aumento da frequência de lamelipódios não produtivos, por serem instáveis e retrair com frequência. A glicose não afetou a velocidade de formação dos lamelipódios, sugerindo que a polimerização de actina não estava alterada, mas reduziu a maturação das adesões junto à matriz e aumentou a atividade das GTPases Rac1 e RhoA (LAMERS et al., 2011). Todos estes efeitos, com exceção da ativação de RhoA, foram revertidos na presença de um agente antioxidante (LAMERS et al., 2011).

Demonstramos que a migração de fibroblastos em matriz tridimensional de colágeno e fibronectina está igualmente prejudicada (cerca de 60% de redução da velocidade de migração) (ALMEIDA, 2011). A migração numa matriz tridimensional envolve não apenas o citoesqueleto (nesta matriz a contratilidade é particularmente importante), mas também a atividade proteolítica celular. As células são capazes de remodelar a matriz, dependendo de suas propriedades e das características físicas da mesma, e as integrinas são os principais receptores que participam desta remodelação (DEMALI; WENNERBERG; BURRIDGE, 2003; HUMPHRIES et al., 2004). A expressão de integrinas ligantes de fibronectina mostrou-se reduzida em fibroblastos dérmicos derivados de ratos diabéticos, assim como a síntese de fibronectina pericelular (ALMEIDA et al., 2016). A adição de fibronectina extracelular, embora tenha acelerado a migração dos fibroblastos derivados de diabéticos, não foi capaz de reverter a deficiência na migração.

Embora a regulação da função de GTPases Rho clássicas ocorra majoritariamente via GDI/GEFs e GAPs, conforme já mencionado, em alguns tecidos e órgãos é possível que esta regulação ocorra também por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais (LIU et al., 2012). Neste sentido, os microRNAs (miRNAs), pequenas moléculas de RNA que hibridizam com moléculas de RNA mensageiro e afetam a expressão de determinadas proteínas, têm trazido maior complexidade à compreensão desta via de sinalização. É possível que alguns miRNAs sejam regulados pela hiperglicemia, participando assim das alterações funcionais observadas em células de diabéticos.

1.5 Hiperglicemia, Migração Celular e MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são RNAs não-codificantes, cujo tamanho varia de 17 a 25 nucleotídeos. Estas moléculas regulam diversos mecanismos celulares, tais como diferenciação, apoptose, adesão, proliferação e migração celular, além de contribuir diretamente para o remodelamento da matriz extracelular (BARTEL, 2004; LIU et al., 2012). Para exercer tal controle, interagem preferencialmente com a região 3' UTR (*untranslated region*) de um mRNA alvo, que tem sua expressão ou tradução suprimida (JASKIEWICZ; FILIPOWICZ, 2008; MORSCZECK et al., 2005; SEO et al., 2004).

Evidências mostram que microRNAs (miRNAs) podem afetar a migração celular por meio da regulação da expressão de GTPases Rho, seus efetores e seus reguladores

(GEFs, GAPs ou GDIs) – (SEONG-YEON et al., 2009; VALASTYAN; WEINBERG, 2011). A figura 7 exemplifica como os miRNAs poderiam regular as RhoGTPases (HUANG; HE, 2010).

Figura 7 – MiRNAs e GTPases Rho.

A cascata de sinalização das GTPases Rho desempenha um papel central na regulação da adesão celular, migração e citoesqueleto. MiRNAs podem afetar a migração celular através da regulação da expressão de GTPases, bem como de seus efetores (PAK, ROCK) e reguladores (RhoGDI, HOXD10). Fonte: (HUANG; HE, 2010).

O papel de miRNAs sobre a migração celular, no entanto, parece ser tecido-específico. Os miRNAs miR-221 e miR-222, por exemplo, aumentam a migração e invasão de células de câncer colorretal, câncer de mama (BLBC - *basal-like breast cancer*) e câncer de próstata (QIN; LUO, 2014; LI et al., 2014; YANG et al., 2014). Corroborando estes resultados, He et al., (2015) observaram que a diminuição da expressão de miR-221 inibiu a migração e a invasão de células de carcinoma epidermóide em humanos. Por outro lado, Li et al., (2009) observaram que o miR-221 diminuiu a migração de células endoteliais umbilicais humanas - HUVECs. Da mesma forma, em nosso grupo de pesquisa, observamos um papel inibitório do miR-221 e miR-222 na migração e invasão de células de carcinoma de tireóide (resultados não publicados).

Outro miRNA que afeta a migração celular é o miR-29; estudos mostraram que este miRNA inibiu a migração e invasão de células de carcinoma epidermóide de cabeça e

pescoço - HNSCC e de adenocarcinoma (HAN et al., 2014; KINOSHITA et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2013).

Frequentemente, miRNAs que afetam a migração celular alteram também a proliferação celular; isso ocorre, por exemplo, com o miR-221 e miR-222, que promoveram a entrada na fase S de células de câncer de mama, e também com o miR-29 (HAN et al., 2014; KINOSHITA et al., 2013; LI et al., 2014; YAMAMOTO et al., 2013).

Conforme já mencionado, a expressão alterada de miRNAs tem sido associada a diferentes doenças, incluindo-se artrite, câncer e DM (MADHYASTHA et al., 2011; ASAHARA, 2016; KAWAGUCHI et al., 2016; LI et al., 2016). Em dermatites atópicas também foram encontradas alterações em miRNAs, como o miR-223, miR-122 e miR-203 (ROZALSKI; RUDNICKA; SAMOCHOCKI, 2016). De maneira geral, procura-se estudar miRNAs que possam auxiliar num diagnóstico diferencial, fornecer um prognóstico ou até mesmo servir como um alvo terapêutico.

Conforme descreveremos a seguir, a literatura tem demonstrado que a expressão de miRNAs pode ser regulada pela hiperglicemia e hiperinsulinemia, e também que miRNAs podem estar envolvidos na resistência à insulina e na etiologia do DM. Madhyastha et al., (2011) mostraram que 14 miRNAs estavam diferencialmente expressos na pele de camundongos diabéticos, sendo miR-146b e miR-21 os mais notáveis. Os níveis basais dos miRNAs miR-20b, miR-10a, miR-10b, miR-96, miR-128, miR-452 e miR-541 apresentaram-se semelhantes entre animais controle e diabéticos, mas sua expressão foi alterada durante a cicatrização cutânea. O miR-21, por sua vez, regulou positivamente a migração de fibroblastos.

No DM tipo 2, Villard et al., (2015) observaram aumento da expressão de miR-29a, miR-222 e miR-221. Constantino et al., (2016) relacionaram o aumento de miR-29a com hiperglicemia, levando ao crescimento de cardiomiócitos. Li et al., (2009) observaram que o aumento da glicemia gerava um aumento na expressão de miR-221 em HUVECs e uma diminuição na migração destas células e, interessante, a inibição de miR-221 nessas células restaurava a migração celular. YANG et al., (2014) mostraram que a glicose elevada reduziu a expressão de miR-222 em artérias renais de ratos diabéticos, aumentando a expressão de ROCK; este resultado sugere que ROCK é um dos alvos do miR-222 naquelas células. Num estudo de expressão diferencial de miRNAs modulados pela DM tipo 2 em tecidos alvo de insulina, o miR-222 mostrou-se alterado (HERRERA et al., 2010).

He et al., (2007) mostraram que miR-29a/b/c podem ser induzidos por glicose e insulina elevadas, e a superexpressão desses miRNAs, por sua vez, leva à resistência à insulina. O miR-29a também foi estudado por Zhao et al., (2011) em mulheres grávidas. Este estudo mostrou que o miR-29a e o miR-222 estavam superexpressos em soro de mulheres grávidas em estágio anterior à detecção do diabetes gestacional, no início do segundo trimestre, retornando aos níveis normais após a comprovação do diabetes. Sendo assim, estes dois miRNAs poderiam ser usados como biomarcadores para diagnóstico do diabetes gestacional. Corroborando os resultados acima, Shi et al., (2014) também observaram que miR-222 pode estar envolvido na resistência à insulina, possivelmente por efeitos de vias regulatórias de receptor de estrógeno e, com isso, ser um candidato a biomarcador e alvo terapêutico para o diabetes gestacional. Li, Pan e Qiu, (2016) mostraram que miR-221/222 podem participar do aparecimento e progressão do DM tipo 2 com complicação de câncer de mama pós-menopausa, uma vez que estes miRNAs participam da resistência à insulina e a combinação de miR-221/222 e estrógeno contribui para a incidência do DM tipo 2 com estas complicações.

Outros estudos também mostraram não apenas uma relação entre DM e expressão de miRNAs, mas também uma possível relação com algumas complicações do DM. Neste sentido, WANG et al., (2012) observaram diminuição de miR-29 em camundongos diabéticos com fibrose renal inicial. Torre et al., (2015) observaram um aumento maior de miR-221 em pacientes diabéticos com retinopatia em relação aos pacientes diabéticos sem esta patologia.

1.6 MicroRNAs e Periodonto

O estudo da expressão de miRNAs no periodonto e sua potencial relação com a fisiologia e patologias é bastante recente. Stoecklin-Wasmer et al., (2012) fizeram um *screening* de miRNAs em células de gengiva de pacientes saudáveis e com doença periodontal; curiosamente, o miR-29 mostrou-se como um dos miRNAs mais alterados na doença periodontal. Um estudo realizado por Kagiya (2016), apontou que miR-29a/b/c, miR-31 e miR-223, entre outros, estão envolvidos na homeostase e patologia do periodonto, podendo ser utilizados como biomarcadores e alvos terapêuticos para a perda de osso alveolar na doença periodontal. Irwandi e Vacharaksa, (2016) consideram que miRNAs, como p.ex. o

miR-223, estão relacionados com a inflamação no periodonto e com a perda de osso alveolar, sugerindo o potencial uso dessas moléculas como alvos terapêuticos. Da mesma forma, Tomofuji et al., (2016) demonstraram que miR-207, miR-495 e miR-376b-3p poderiam ser utilizados como biomarcadores para periodontite. De fato, alguns miRNAs, como por exemplo o miR-126, miR-141, miR-210 e miR-146, regulam a expressão de citocinas inflamatórias (IL-8 e CXCL1) em epitélio gengival humano (CHEN et al., 2016b). Particularmente com relação ao metabolismo ósseo, a associação de miRNAs com a osteoclastogênese induzida pelo ligante nuclear factor kappa B (RANKL), regulada por mediadores inflamatórios, foi demonstrada em células do LP e fibroblastos gengivais (IRWANDI; VACHARAKSA, 2016).

Na periodontite apical provocada por lesão endodôntica, 381 miRNAs estão diferencialmente expressos, em comparação a tecido normal. Genes-alvo desses miRNAs incluem mediadores da resposta inflamatória, como interleucina-6 (IL-6), a metaloproteinase de matriz MMP-9 e o fator de crescimento pró-fibrótico TGF- β (CHAN et al., 2013). Embora a idéia de miRNAs presentes na saliva serem utilizados para diagnóstico de periodontite seja interessante, esta técnica ainda não está padronizada de maneira confiável (SCHMALZ et al., 2016).

Com relação à diferenciação celular e terapias regenerativas, Hung et al., (2010) demonstraram que o miR-146a regula a diferenciação de células do LP por meio da regulação negativa da sinalização de NF-KB, um fator de transcrição que modula a expressão de mediadores inflamatórios. Além disso, o miR-17 regula indiretamente a osteogênese, por meio da via de sinalização de Wnt, que exerce papel importante na formação óssea (LIU et al., 2013). MiR-21 e miR-101 também regulam a diferenciação osteogênica de células do ligamento periodontal, tendo como principal alvo a proteína PLAP-1 (LI et al., 2012). Vasanthan et al., (2015) mostraram que em células tronco de polpa dentária, miR-221 é superexpresso quando comparado com células tronco mesenquimais de medula óssea, sendo esta informação relevante com relação à escolha de fontes para possíveis tratamentos.

Além da doença periodontal, miRNAs também têm sido relacionados à movimentação ortodôntica. Chen et al., (2016a) observaram que miR-21 está relacionado com a remodelação óssea durante a movimentação dentária, assim como o miR-221 e miR-222 (WEI et al., 2014).

Em resumo, o estudo do papel de miRNAs na fisiopatologia periodontal é ainda incipiente; embora alguns *screenings* tenham revelado uma expressão diferencial de miRNAs na doença periodontal, a potencial modulação de miRNAs no DM e sua relação com a doença periodontal não foram ainda estudados. O conhecimento adquirido nesta área será benéfico para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, especialmente aquelas que eventualmente utilizem miRNAs para tratar a doença periodontal

2 CONCLUSÃO

Neste estudo concluímos que, em células do ligamento periodontal humano:

- A glicose elevada não alterou a proliferação celular, mas inibiu significativamente a migração celular e aumentou a morte celular por uma via de apoptose que envolve a ativação de caspase 3
- As células expressaram miR-29a (mas não miR-29ax), miR-221 e miR-222; a expressão de miR-221 e miR-222 foi modulada negativamente pela elevada concentração de glicose
- MiR-221 e miR-222 estimularam a migração celular e reduziram a morte celular por apoptose, e poderiam estar envolvidos nos efeitos promovidos pela glicose elevada

REFERÊNCIAS¹

- ALMEIDA, M. E. S. **Hiperglicemia e interação fibroblasto-matriz extracelular - influências na adesão e migração em substratos bidimensional e tridimensional**. 2011. 21 f. Mestrado (Dissertação) - Instituto de Ciências Biomédicas da USP, São Paulo, 2011.
- ALMEIDA, M.E. et al. Hyperglycemia reduces integrin subunits alpha v and alpha 5 on the surface of dermal fibroblasts contributing to deficient migration. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 421, n. 1-2, f. 19-28, 2016.
- ARNOLD, N. Et al. Regulation of cardiac expression of the diabetic marker microRNA miR-29. **PLoS One** v. 9, n. 7, e103284, 2014.
- ASAHARA, H. Current status and strategy of microrna research for cartilage development and osteoarthritis pathogenesis. **Journal of Bone Metabolism**, v. 23, f. 121–127, 2016.
- ASPENSTRÖM, P.; FRANSSON, A.; SARAS, J. Rho gtpases have diverse effects on the organization of the actin filament system. **Journal of Biochemistry**, v. 377, f. 327– 337, 2004.
- BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n.2, f. 281-297, 2004.
- BEERTSEN, W.; MCCULLOCH, C. A. G.; SODEK, J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. **Periodontology** 2000, v. 13, f. 20–40, 1997.
- BELMONTE, M. A. et al. Light-induced photoreceptor degeneration in the mouse involves activation of the small gtpase rac1. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 47, n. 3, f. 1193–1200, 2006.
- BLOGGER. Esquema de movimentação ortodôntica. Disponível em: <<http://1.bp.blogspot.com/>>. Acesso em: 27 out. 2016.
- BRAGA, S. M. G. et al. Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. **European Journal of Oral Sciences**, v. 119, f. 7–14, 2011.
- BROGNARA, E. et al. High levels of apoptosis are induced in human glioma cell lines by co-administration of peptide nucleic acids targeting miR-221 and miR-222. **International Journal of Oncology**, v. 48, n. 3, f. 1029-1038, 2016.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 144, f. 813–820, 2001.
- BYUN, K et al. Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, pii: S0163-7258(17)30044-X. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.030, 2017.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CARNEIRO, J.; MORAES, F.F. Radioautographic visualization of collagen metabolism in the periodontal tissues of the mouse. **Archives of Oral Biology**, v. 10, n. 6, f. 833-848, 1965.

CHAN, L. T. et al. Micrnas: new insights into the pathogenesis of endodontic periapical disease. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 12, f. 1498–1503, 2013.

CHEN, N. et al. microrna-21 contributes to orthodontic tooth movement. **Journal of Dental Research**, v. 95, f. 1425–1433, 2016.

CHEN, S. C. et al. Micrnas regulate cytokine responses in gingival epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 84, 2016.

CHEN, Y. et al. Cyclic stretch and compression forces alter microrna-29 expression of human periodontal ligament cells. **Gene**, v. 566, n. 1, f. 13–17, 2015.

CODMED. Desenho de um dente inserido no alvéolo. Disponível em:<<http://www.codmed.com.ar/>>. Acesso em: 27 out. 2016.

CONSTANTINO, S. et al. Microrna profiling unveils hyperglycaemic memory in the diabetic heart. **European Heart Journal**, v. 37, f. 572–576, 2016.

CYTOCHEMISTRY. Esquema de uma célula aderente que pode ser um fibroblasto. Disponível em: <<http://cytochemistry.net/>>. Acesso em: 27 out. 2016.

DANAEI, G. et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. **Lancet**, v. 378, n. 9785, f. 31–40, 2011.

DEMALI, K. A.; WENNERBERG, K.; BURRIDGE, K. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 5, f. 572–582, 2003.

DENTAZONE. Esquema de um dente inserido no alvéolo com lesão periapical por contaminação endodôntica. Disponível em: <<http://dentazone.ru/>>. Acesso em: 27 out. 2016.

DEVREOTES, P.; HORWITZ, A.R. Signaling networks that regulate cell migration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 8, a005959, 2015.

DIAO, Y.; FU, H.; WANG, Q. MiR-221 Exacerbate Cell Proliferation and Invasion by Targeting TIMP3 in Papillary Thyroid Carcinoma. **American Journal of Therapeutics**, 2016 (no prelo).

FALK, H.; HUGOSON, A.; THORSTENSSON, H. Number of teeth, prevalence of caries and periapical lesions in insulin-dependent diabetics. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 97, n. 3, f. 198–206, 1989.

FENG, Y. et al. Subcellular localization of caspase-3 activation correlates with changes in apoptotic morphology in MOLT-4 leukemia cells exposed to X-ray irradiation. **International Journal of Oncology**, v. 27, n. 3, f. 699-704, 2005.

GIACCO, F; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**. V. 107, n. 9, f. 1058-1070, 2010.

GONZALEZ-SERRANO, J. et al. Prevalence of Oral Mucosal Disorders in Diabetes Mellitus Patients Compared with a Control Group. **Journal of Diabetes Research**, 2016:5048967, 2016.

GRZESIK, W. J.; NARAYANAN, A. S. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 13, n. 6, f. 474–484, 2002.

HALFON, S. et al. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. **Stem Cell and Development**, v. 20, n. 1, f. 53–66, 2011.

HALL, A. Rho gtpases and the control of the cell behavior. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 5, f. 891–895, 2005.

HAN, H. S. et al. Microrna-29a suppresses the growth, migration, and invasion of lung adenocarcinoma cells by targeting carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule. **FEBS Letters**, v. 588, f. 3744 – 3750, 2014.

HARA, E. S. et al. mirna-720 controls stem cell phenotype, proliferation and differentiation of human dental pulp cells. **Plos One**, v. 8, 2013. Issue 12 e83545.

HE, A. et al. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3t3-l1 adipocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 21, n. 11, f. 2785–2794, 2007.

HE, S. et al. Downregulation of mir-221 inhibits cell migration and invasion through targeting methyl-cpg binding domain protein 2 in human oral squamous cell carcinoma cells. **BioMed Research International**, 2015.

HERRERA, B. M. et al. Global microrna expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 53, f. 1099–1109, 2010.

HORWITZ, R.; WEBB, D. Cell migration. **Current Biology**, v. 13, n. 19, f. 756–759, 2003.

HUANG, S.; HE, X. Micrnas: tiny rna molecules, huge driving forces to move the cell. **Protein & Cell**, v. 1, n. 10, f. 916–926, 2010.

HUMPHRIES, M. J. et al. Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins. **Biochemichal Society Transactions**, v. 32, n. 5, f. 822–825, 2004.

HUNG, P. S. et al. mir-146a induces differentiation of periodontal ligament cells. **Journal Dental Research**, v. 89, n. 3, f. 252–257, 2010.

HUVENEERS, S.; DANEN, E. H. J. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, src and rho. **Journal of Cell Science**, v. 122, f. 1059–1069, 2009.

IRWANDI, R. A.; VACHARAKSA, A. The role of microrna in periodontal tissue: A review of the literature. **Archives of Oral Biology**, v. 72, f. 66–74, 2016.

JASKIEWICZ, L.; FILIPOWICZ, W. Role of dicer in posttranscriptional rna silencing. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 320, f. 77–97, 2008.

KAGIYA, T. Micrnas: Potential biomarkers and therapeutic targets for alveolar bone loss in periodontal disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, f. 1317, 2016.

KATO, H. et al. High glucose concentrations suppress the proliferation of human periodontal ligament stem cells and their differentiation into osteoblasts. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 4, f. 44–51, 2016.

KAWAGUCHI, T. et al. Circulating micrnas: A next-generation clinical biomarker for digestive system cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, f. 1459, 2016.

KIM, H. S. et al. Effects of high glucose on cellular activity of periodontal ligament cells in vitro. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 74, f. 41–47, 2006.

KINOSHITA, T. et al. Tumour-suppressive micrna-29s inhibit cancer cell migration and invasion by targeting laminin-integrin signalling in head and neck squamous cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 109, f. 2636 – 2645, 2013.

KOMERS, R. Rho kinase inhibition in diabetic kidney disease. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 76, n. 4, f. 551–559, 2013.

LAMERS, M. L. et al. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. **Plos One**, v. 6, n. 8, f. e22865, 2011.

LEE, D. et al. Targeted disruption of rock1 causes insulin resistance in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, f. 11776–11780, 2009.

LI, M.; LI, C.Z. High glucose improves healing of periodontal wound by inhibiting proliferation and osteogenetic differentiation of human PDL cells. **International Wound Journal**, v. 13, n. 1, f. 39-43, 2016.

LI, C. et al. mir-21 and mir-101 regulate plak-1 expression in periodontal ligament cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 5, n. 5, f. 1340–1346, 2012.

LI, M. Y.; PAN, S. R.; QIU, A. Y. Roles of micrna-221/222 in type 2 diabetic patients with post-menopausal breast cancer. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, f. 1–10, 2016.

LI, T. et al. Diabetes and hyperlipidemia induce dysfunction of vsmcs: contribution of the metabolic inflammation/mirna pathway. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 308, f. 257–269, 2014.

LI, X. et al. Periodontal ligament remodeling and alveolar bone resorption during orthodontic tooth movement in rats with diabetes. **Diabetes Technology and Therapeutics**, v. 12, n. 1, f. 65–73, 2010.

LI, Y. et al. micrna-221 regulates high glucose-induced endothelial dysfunction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 381, f. 81–83, 2009.

LI, Z. et al. The role of micrnas in intrahepatic cholangiocarcinoma. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 20, f. 1–8, 2016.

LIU, J. et al. High levels of glucose induces a dose-dependent apoptosis in human periodontal ligament fibroblasts by activating caspase-3 signaling pathway. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, f. 1458–1471, 2013.

LIU, J. et al. High levels of glucose induced the caspase-3/PARP signaling pathway, leading to apoptosis in human periodontal ligament fibroblasts. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 66, n. 2, f. 229-237, 2013.

LIU, M. et al. Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 7, f. 365-373, 2012.

LO, J. F. et al. The epithelial-mesenchymal transition mediator s100a4 maintains cancer-initiating cells in head and neck cancers. **Cancer Research**, v. 71, n. 5, f. 1912– 1923, 2010.

LU, G.J. et al. miRNA-221 promotes proliferation, migration and invasion by targeting TIMP2 in renal cell carcinoma. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n.5, f. 5224-5229, 2015.

LUBBOCK, M. J. et al. Development and cell fate in interspecific (mus musculus/ mus caroli) intraocular transplants of mouse molar tooth-germ tissues detected by in situ hybridization. **Archives of Oral Biology**, v. 41, f. 77–84, 1996.

MADHYASTHA, R. et al. Microrna signature in diabetic wound healing: promotive role of mir-21 in fibroblast migration. **International Wound Journal**, v. 10, n. 1111, f. 1742– 481, 2011.

MAIESE, K. New insights for oxidative stress and diabetes mellitus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, f. ID 875961, 2015.

MARK, H. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. **Nutrients**, v. 6, f. 2165–2178, 2014.

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

MASCARENHAS, M. et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. **Plos Medicine**, v. 9, n. 12, f. e1001356, 2012.

MBINFO. Esquema de uma célula com os locais de influência de Rho GTPases. Disponível em: <<https://www.mechanobio.info/>>. Acesso em: 27 out 2016.

MESGARANI, A. et al. Frequency of odontogenic periradicular lesions in diabetic patients. **Caspian Journal International Medicine**, v. 5, n. 1, f. 22–25, 2014.

MORSCZECK, C. et al. Isolation of precursor cells (pcs) from human dental follicle of wisdom teeth. **Matrix Biology**, v. 24, f. 155–165, 2005.

MROCZEK, J. A.; PYTRUS, H. Z.; HOJLO, M. M. Caspase-dependent apoptosis of retinal ganglion cells during the development of diabetic retinopathy. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 24, n. 3, f. 531–535, 2015.

NAKAJIMA, R. et al. Mesenchymal stem/progenitor cell isolation from tooth extraction sockets. **Journal Dental Research**, v. 93, n. 11, f. 1133–1140, 2014.

NISHIMURA, F. et al. Glucose-mediated alteration of cellular function in human periodontal ligament cells. **Journal of Dental Research**, v. 75, n. 9, f. 1664–1671, 1996.

NOBES, C. D.; HALL, A. Rho gtpases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. **Journal of Cell Biology**, v. 144, n. 6, f. 1235–1244, 1999.

OHGI, S.; JOHNSON, P.W. Glucose modulates growth of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells: correlation with expression of basic fibroblast growth factor. **Journal of Periodontal Research**, v. 31, n. 8, f. 579–588, 1996.

ORTEGA, F.J. et al. Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization. **Diabetes Care**, v. 37, n. 5, f. 1375–1383, 2014.

PALMER, R. M.; LUMSDEN, A. G. Development of periodontal ligament and alveolar bone in homografted recombination's of enamel organs and papillary, pulpal, and follicular mesenchyme in the mouse. **Archives of Oral Biology**, v. 32, f. 281–289, 1987.

PARSONS, J. T.; HORWITZ, A. R.; SCHWARTZ, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, f. 633–643, 2010.

PATEL, V. et al. Persistent activation of rac 1 in rac in squamous carcinomas of the head and neck: evidence for an egfr/vav2 signaling axis involved in cell invasion. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 6, f. 1145–1152, 2007.

PESSOA, A. **A administração sistêmica e tópica de vitaminas antioxidantes acelera a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos**. 2014. 44 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PESSOA, A.F. et al. Oral administration of antioxidants improves skin wound healing in diabetic mice. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 6, f. 981–993, 2016.

PHAN-LAI, V. et al. Three-dimensional scaffolds to evaluate tumor associated fibroblast-mediated suppression of breast tumor specific t cells. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 5, f. 1330–1337, 2013.

PRESHAW, P. M. et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. **Diabetologia**, v. 55, f. 21–31, 2012.

QIN, J.; LUO, M. MicroRNA-221 promotes colorectal cancer cell invasion and metastasis by targeting reck. **FEBS Letters**, v. 588, f. 99 – 104, 2014.

QUINTAVALLE, C. et al. miR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphate PTP μ . **Oncogene**, v. 31, n.7, f. 858-868, 2012.

RIDLEY, A. J. Stress fibres take shape. **Nature Cell Biology**, v. 1, f. E64–66, 1999.

RIDLEY, A. J. Rho proteins: linking signalling with membrane trafficking. **Traffic**, v. 2, f. 303–310, 2003.

ROZALSKI, M.; RUDNICKA, L.; SAMOCHOCKI, Z. Mirna in atopic dermatitis. **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 33, n. 3, f. 157–162, 2016.

SAITO, M. T. et al. Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. **World Journal of Stem Cell**, v. 7, n. 2, f. 399–407, 2015.

SCHMALZ, G. et al. Micrnas as salivary markers for periodontal diseases: A new diagnostic approach? **BioMed Research International**, f. 1–14, 2016.

SEGURA-EGEA, J. J. et al. Diabetes mellitus, periapical inflammation and endodontic treatment outcome. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, v. 17, n. 2, f. e356–61., 2012.

SEGURA-EGEA, J. J. et al. High prevalence of apical periodontitis amongst type 2 diabetic patients. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 8, f. 564–569., 2005.

SEO, B. M. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, f. 149–155, 2004.

SEONG-YEON, P. et al. mir-29 irnas activate p53 by targeting p85a and cdc42. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 1, 2009.

SHI, Z. et al. Differential expression of micrnas in omental adipose tissue from gestational diabetes mellitus subjects reveals mir-222 as a regulator of α expression in estrogen-induced insulin resistance. **Endocrinology**, v. 155, n. 5, f. 1982 – 1990, 2014.

SONNENSCHN, S.; MEYLE, J. Local inflammatory reactions in patients with diabetes and periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 69, n. 1, f. 221–254, 2015.

STOECKLIN-WASMER, C. et al. Micrnas and their target genes in gingival tissues. **Journal of Dental Research**, v. 91, n. 10, f. 934–940, 2012.

STRUTZ, F. et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: Fsp1. **Journal of Cell Biology**, v. 130, n. 2, f. 393–405, 1995.

SUN, C. C. et al. Y-27632, a rock inhibitor, promoted limbal epithelial cell proliferation and corneal wound healing. **Plos One**, v. 10, n. 12, f. e0144571, 2015.

ŚLUSARZ, A.; PULAKAT, L. The two faces of miR-29. **Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 16, n. 7, f. 480-490, 2015.

TAKAI, Y.; SASAKI, T.; MATOZAKI, T. Small gtp-binding proteins. **Journal of Anatomy**, v. 125, f. 183–197, 2001.

TAKENAGA, K.; NAKAMURA, Y.; SAKIYAMA, S. Expression of antisense rna to s100a4 gene encoding an s100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic lewis lung carcinoma cells. **Oncogene**, v. 14, f. 331–337, 1997.

TEIXEIRA, A.L.; GOMES, M.; MEDEIROS, R. EGFR signaling pathway and related-miRNAs in age-related diseases: the example of miR-221 and miR-222. **Frontiers in Genetics**, v. 3, f. 286, 2012.

TILSON, S. G. et al. Rock inhibition facilitates in vitro expansion of glioblastoma stemlike cells. **Plos One**, v. 10, n. 7, f. e0132823, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0132823.

TOMOFUJI, T. et al. Micrnas as serum biomarkers for periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 43, n. 5, f. 418–425, 2016.

TORRE, N. G. D. L. et al. Expression of angiogenic micrnas in endothelial progenitor cells from type 1 diabetic patients with and without diabetic retinopathy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 56, f. 4090–4098, 2015.

TRACY, L.E.; MINASIAN, R.A.; CATERSON, E.J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. **Advances in Wound Care**, v.5, n.3, f. 119-136, 2016.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. Roles for micrnas in the regulation of cell adhesion molecules. **Journal of Cell Science**, v. 24, f. 999–1006, 2011.

VASANTHAN, P. et al. Differential expression of basal micrnas' patterns in human dental pulp stem cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 19, n. 3, f. 566–580, 2015.

VILLARD, A. et al. Diagnostic value of cell-free circulating micrnas for obesity and type 2 diabetes: A meta-analysis. **Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis**, v. 6, n. 6, 2015.

VISHNUBHOTLA, R. et al. Treatment with y-27632, a rock inhibitor, increases the proinvasive nature of sw620cells on 3dcollagen type1matrix. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, 2012.

VOZIYAN, P. et al. Site-specific AGE modifications in the extracellular matrix: a role for glyoxal in protein damage in diabetes. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 52, n. 1, f. 39-45, 2014.

WANG, B. et al. Suppression of microrna-29 expression by tgf-b1 promotes collagen expression and renal fibrosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, f. 252 – 265, 2012.

WEI, F. et al. Mechanical force-induced specific microrna expression in human periodontal ligament stem cells. **Cells, Tissues, Organs**, v. 199, n. 5-6, f. 353–363, 2014.

XU, C. et al. Chitosan as a barrier membrane material in periodontal tissue regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 28, f. 32662, 2012.

XU, R. et al. Periodontitis promotes the diabetic development of obese rat via mir-147 induced classical macrophage activation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 83, f. 892–897, 2016.

YAMAMOTO, N. et al. Tumor-suppressive microrna-29a inhibits cancer cell migration and invasion via targeting hsp47 in cervical squamous cell carcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 43, f. 1855 – 1863, 2013.

YANG, X. et al. Down-regulation of mir-221 and mir-222 restrain prostate cancer cell proliferation and migration that is partly mediated by activation of sirt1. **Plos One**, v. 9, n. 6, f. e98833, 2014.

YOSHIDA, T. et al. Current status and future development of cell transplantation therapy for periodontal tissue regeneration. **International Journal of Dentistry**, v. 2012, f. 1–8, 2012.

YU, Z. et al. Rock inhibition with y27632 promotes the proliferation and cell cycle progression of cultured astrocyte from spinal cord. **Neurochemistry International**, v. 61, f. 1114 – 1120, 2012.

ZHANG, L. et al. Effects of IL-10 and glucose on expression of OPG and RANKL in human periodontal ligament fibroblasts. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 49, n. 4, e4324, 2016.

ZHAO, C. et al. Early second-trimester serum mirna profiling predicts gestational diabetes mellitus. **Plos One**, v. 6, n. 8, f. e23925, 2011.

ZHOU, L. et al. Downregulation of miR-221/222 by a microRNA sponge promotes apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells through upregulation of PTEN. **Oncology Letters**, v. 12, n. 6, f. 4419-4426, 2016.

ZHOU, Y. et al. Periodontal healing by periodontal ligament cell sheets in a teeth replantation model. **Archives of Oral Biology**, v. 5, f. 169 – 176, 2012.