ELISABETH MIE HOSAKA

Comparação de modificações nos comportamentos celular e gênico de fibroblastos derivados de úlcera de membro inferior em indivíduos diabéticos e de pele normal

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Cirurgia Plástica
Orientadora: Dra. Mônica Beatriz Mathor

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Hosaka, Elisabeth Mie
Comparação de modificações nos comportamentos celular e gênico de fibroblastos derivados de úlcera de membro inferior em indivíduos diabéticos e de pele normal / Elisabeth Mie Hosaka. -- São Paulo, 2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Cirurgia Plástica.
Orientadora: Mônica Beatriz Mathor.

Descritores: 1.*Diabetes mellitus* 2.Pé diabético 3.Expressão gênica 4.Fibroblastos

USP/FM/DBD-481/10

A Deus,

porque nada nos é possível se não for de Sua vontade.

Agradecimentos

Aos meus pais, pelos ensinamentos, incentivos e exemplos de vida do que é Ser o que se ensina.

Ao Prof. Dr. Marcus Castro Ferreira, pela oportunidade concedida e pela confiança depositada.

À Dra. Mônica Beatriz Mathor, a quem muito admiro como pesquisadora, pela disposição incansável em ensinar.

Ao Dr. César Isaac, pela amizade, incentivo, dedicação e paciência.

Ao meu esposo, Seiziro Marco Hirai, pela paciência, apoio e compreensão em muitos momentos. Obrigada por me esperar!

À Bióloga, Silvana Cereijido Altran, por compartilhar sua experiência, com seu jeito sempre humilde e singelo.

Ao Prof. Dr. Carlos Antonio Moreira Filho e à Dra. Patrícia Locosque Ramos – LIM 36, pela valiosa e fundamental colaboração para concretização deste trabalho.

À Prof. Dra. Helena Brentani, Renato Puga e Leandro Lima do Laboratório de Biotecnologia do Hospital A. C. Camargo, pela colaboração nas análises de bioinformática.

Ao Prof. Daniel Kashiwamura Scheffer, pela atenção e paciência na orientação das análises estatísticas.

Aos “amigos do laboratório”: Edna Maria Rodrigues dos Santos, Silvana Biaggione, Roqueline Alves Lago, Renata Oliveira Conceição, Maria Aparecida de Oliveira e Bruno Valério do Rosário, pelo companheirismo nas rotinas do
LIM 04.

Aos amigos Luzia Nahoyo Oka Horiuchi e tantos outros docentes da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pelo apoio e incentivo.

À amiga Patrícia Campos Pavan Baptista, que sempre trouxe incentivo e soube compartilhar os momentos bons e os difíceis.

A todos os amigos e colegas, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

À FAPESP pelo financiamento de equipamentos e insumos utilizados nesse trabalho.

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos."

Marie Curie (1867-1934)

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 12

3. MÉTODOS 13

3.1 Aspectos éticos 13

3.2 Critérios de Elegibilidade 14

3.3 Obtenção e cultivo de fibroblastos 15

3.4 Determinação dos grupos de estudo 17

3.5 Proliferação celular 18

3.6 Contração da matriz de colágeno 18

3.7 Análise estatística dos ensaios de proliferação e contração da matriz de colágeno 20

3.8 Perfil de Expressão Gênica (DNA Microarray) 20

3.8.1 Extração do RNA total 20

3.8.2 Análise da Qualidade do RNA 21

3.8.3 Hibridização e análise da expressão gênica 23

3.8.4 Análise de bioinformática dos dados 24

3.8.5 Análise da Interação Transcricional 25

3.8.6 Confirmação dos dados de microarranjo por PCR em tempo real 26

4. RESULTADOS **28**

4.1 – Cultura de fibroblastos 28

4.2 – Proliferação celular 29

4.3 Contração da matriz de colágeno 32

4.4 Perfil de expressão gênica 34

4.4.1 Quantificação e controle de qualidade do RNA extraído 34

4.4.2 Análise de bioinformática dos dados 36

4.4.3 Ontologias gênicas 41

4.5 Validação de genes diferencialmente expressos 55

5 DISCUSSÃO **57**

6. CONCLUSÕES **79**

7 ANEXOS **80**

Anexo A – Aprovação do estudo pela Comissão de Ética 80

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 81

8 - REFERÊNCIAS **83**

LISTA DE SIGLAS

Cy3	cianina 3
DNA	ácido desoxirribonucléico
DM	Diabetes melito
DMEM	*Dulbeco Modified Eagle's Médium* (meio de Eagle modificado por Dulbeco)
DMSO	dimetil sufóxido
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EP	erro padrão da média
FC	fibroblastos controle
FFD	fibroblastos de ferida de membro inferior de diabético
FGF	*fibroblast growth factor* (fator de crescimento de fibroblastos)
HCl	ácido clorídrico
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
GO	*Gene ontology* (Ontologia gênica)
MO	microscopia óptica
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
PBS	*phosphate buffered solution* (solução tampão fosfatada)
qPCR	reação em cadeia de polimerase em tempo real
R	programa computacional para ambiente gráfico e estatístico
RIN	número de integridade do RNA
ROS	espécies reativas de oxigênio
RNA	ácido ribonucleico
SAM	*Statistical analysis microarray*
SBF	soro bovino fetal
TGF-β	*Transforming growth factor beta*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüência dos primers utilizados nos experimentos de qPCR 27

Tabela 2 - Dados de proliferação de fibroblastos dos grupos FFD e FC.....31

Tabela 3 - Dados da contração de matriz de colágeno 32

Tabela 4 - Quantificação e controle de qualidade das amostras de RNA. 35

Tabela 5 - Íntegra dos 143 genes diferencialmente expressos 36

Tabela 6 - Genes representados em rede de proximidade de temas.....45

Tabela 7 - Genes validados pelo método qPCR 56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases da cicatrização de feridas.....4
Figura 2 - Representação dos procedimentos na técnica de microarray 9
Figura 3 - Exemplo de eletroferograma de RNA de boa qualidade.....22
Figura 4 - Fibroblastos em frascos de cultura 29
Figura 5 - Curvas de proliferação celular 30
Figura 6 - Curva de proliferação celular por pacientes.....31
Figura 7 - Contração da matriz de colágeno pelos grupos FFD e FC 33
Figura 8 - Eletroforese dos RNAs.....34
Figura 9 - Agrupamento hierárquico.....40
Figura 10 - Categorias relevantes de ontologia gênica Processo Biológico.....42
Figura 11 - Categorias relevantes de ontologia gênica Componente Celular 43
Figura 12 - Categorias relevantes de ontologia gênica Função Molecular.....44
Figura 13 - Rede de proximidade de temas 50
Figura 14 - Rede interação transcricional Função Molecular 54
Figura 15 - Níveis de expressão gênica relativa validados pelo qPCR 55

RESUMO

Hosaka EM. *Comparação de modificações nos comportamentos celular e gênico de fibroblastos derivados de úlcera de membro inferior em indivíduos diabéticos e de pele normal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 99p.

Úlcera de membros inferiores é uma das complicações do diabetes melito que acomete aproximadamente 15% dos portadores da doença e resultam em elevada taxa de mortalidade. São feridas de difícil resolução, em geral, refratárias aos diversos tipos de tratamentos. Um dos principais aspectos que contribuem para sua cronicidade é a modificação no comportamento de fibroblastos. O objetivo do estudo foi comparar *in vitro* modificações no comportamento de fibroblastos derivados de ferida de membro inferior de indivíduos diabéticos com fibroblastos derivados de pele normal, quanto a proliferação celular e a capacidade de contração de modelo tridimensional de matriz de colágeno povoado por células, além de investigar o perfil de expressão gênica diferencial dessas células. Para tanto, foram cultivados fibroblastos provenientes de tecido de granulação de feridas de membro inferior de pacientes com diabetes do tipo 2 (FFD) e de pele normal (FC). Foram verificadas anormalidades morfológicas no grupo FFD compatíveis com senescência celular; menor contração da matriz de colágeno povoado por fibroblastos do grupo FFD (redução de 23% da área original) comparado ao grupo FC (redução de 30% da área original – $p<0,001$). Pela técnica de *microarray* foram identificados 143 genes diferencialmente expressos, em sua maioria hipoexpressos, no grupo FFD, dentre os quais, destacam-se aqueles relacionados a processos de senescência e apoptose celular, bem como déficit na síntese e contração de fibras colágenas.

Descritores: *Diabetes mellitus,* Pé diabético, Expressão gênica, Fibroblastos.

SUMMARY

Hosaka EM. *Comparision of changes in cell behavior and genic of fibroblast derived from leg ulcers in diabetic and normal skin* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 99p.

Lower limbs ulcer is one of the complications of diabetes mellitus that affects approximately 15% of the patients and results in high mortality. Wounds that is difficult to heal, generally refractory to many treatments. One of the main aspects that contribute to disease chronicity is the change in the fibroblast behavior. The aim of this study was to compare changes in the *in vitro* fibroblasts behavior from diabetic leg ulcer with fibroblasts derived from normal skin as to cell proliferation and contraction capacity of a three-dimensional fibroblasts populated collagen lattice, as well as to investigate the pattern of differential gene expression in these cells. For this purpose, fibroblasts were cultured from granulation tissue of lower limb ulcer in patients with type 2 diabetes (FFD) and from normal skin (FC). Morphological abnormalities compatible with cellular senescence were observed in the FFD. Reduced matrix contraction in fibroblasts populated group (FFD reduction of 23% from the original area) compared to FC (30% reduction from the original area) - ($p < 0.001$). Using DNA microarray 143 differentially expressed genes were identified, most of them were underexpressed in FFD group, among which are those related to senescence and apoptosis, as well as deficits in the synthesis and contraction of collagen fibers.

Descriptors: Diabetes Mellitus; Diabetic Foot; Gene Expression; Fibroblast.

1. INTRODUÇÃO

O diabetes melito (DM) é um conjunto de alterações metabólicas, primariamente definido por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina e/ou de sua ação.[1,2]

Essa doença tem alcançado proporções epidêmicas em todo o mundo, com preocupantes implicações para a Saúde Pública nos países desenvolvidos e, em especial, nos países em desenvolvimento.[3]

Estima-se que no mundo, 285 milhões de pessoas são acometidas pelo diabetes. De acordo com estudos recentes, acredita-se que a doença possa atingir quase meio bilhão de indivíduos em 2030.[4]

Essa projeção epidêmica é atribuída ao crescimento e envelhecimento populacional, à urbanização e ao aumento da prevalência de obesidade e sedentarismo.[3] No Brasil, o último estudo (1986 a 1988) realizado em nove grandes cidades estimou a prevalência média de diabetes na população adulta em 7,6%.[5]

As principais classes etiopatogênicas do DM são as dos tipos 1 (DM1) e 2 (DM2). O DM1 acomete comumente crianças e adultos jovens. Corresponde a 5 - 10% dos casos de diabetes. Classificado como auto-imune é caracterizado pela destruição das células beta produtoras de insulina, acarretando deficiência absoluta desse hormônio. Clinicamente estes pacientes apresentam sintomas,

clássicos da doença, que precedem o diagnóstico, como poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso.[6, 7]

No Brasil, como na maioria dos países, o DM2 é mais freqüente, acometendo aproximadamente 90% dos diabéticos.[8] O DM2 é mais comum em indivíduos após os 40 anos de idade, sendo causado por um defeito na secreção e na ação (resistência) da insulina.[7] O DM2 apresenta uma longa fase pré-clínica assintomática, que dificulta sua detecção. Essa peculiaridade aumenta o risco de desenvolvimento de complicações macro e microvasculares. E, quando diagnosticada, mais da metade dos indivíduos já apresentam uma ou mais complicações da doença.[9]

Classicamente, as complicações macrovasculares referem-se à aterosclerose e suas seqüelas, enquanto as microvasculares compreendem a retinopatia, nefropatia e neuropatia.

Dentre as diversas complicações microvasculares da doença, a úlcera em membros inferiores (fenômeno clinicamente tão característico que recebe a denominação de “pé diabético”) representa, em todo o mundo, um dos principais problemas de saúde, social e econômico aos portadores de DM.[10,11]

A ferida característica de membro inferior no diabético apresenta atributos peculiares, tais como infecção, ulceração associada à neuropatia e grau variado de vasculopatia periférica.[12] Esta é uma lesão que rompe a integridade da pele com perda do epitélio, e que se estende à derme e estruturas mais profundas, algumas vezes atingindo músculo e osso.[10]

A úlcera de membro inferior em diabéticos e suas complicações representam a principal causa de hospitalização de diabéticos em países desenvolvidos.[11] Aproximadamente 15% dos portadores de DM estão sujeitos ao desenvolvimento dessa úlcera, que precede 85% de todas as amputações não-traumáticas de membro inferior.[13,14] Estima-se que a cada 30 segundos, em alguma parte do mundo, um membro inferior seja amputado como conseqüência do DM.[15] Acredita-se que em um período de cinco anos 39% a 68% dos pacientes com DM morrem, após se submeterem a uma amputação.[16,17]

A prevenção, apesar de ser a estratégia mais econômica e efetiva, ainda está distante de ser realidade. Por isso, a procura por tratamentos tornou-se prioridade. Para tanto, é mister compreender quais processos estão envolvidos nessa ferida.

Freqüentemente a presença de ferida em membros inferiores no diabetes está associada à dor, limitação física, terapias prolongadas e onerosas.

Clinicamente as explicações para o desenvolvimento dessas lesões nos pés estão relacionadas à neuropatia, deformidade nos pés, história prévia de ferida, calçados desconfortáveis e doença vascular periférica.[18,19]

A grande preocupação com estas lesões deve-se a característica recalcitrante para a cicatrização.[20] São classificadas como feridas crônicas por apresentarem uma fase inflamatória persistente, prolongada e que não evolui de modo convencional para as demais fases da cicatrização. Diversos estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que a cicatrização em pacientes com

DM é deficiente.[21,22,23,24] Apesar disso, o mecanismo exato dessa deficiência ainda não foi elucidado.[19]

O processo fisiológico de cura das feridas é uma complexa cascata de eventos altamente integrados, que requer a interação de vias bioquímicas e celulares. Didaticamente, este processo é dividido em fases: inflamatória, proliferativa e de remodelagem que, na verdade, se sobrepõem.[16, 25]

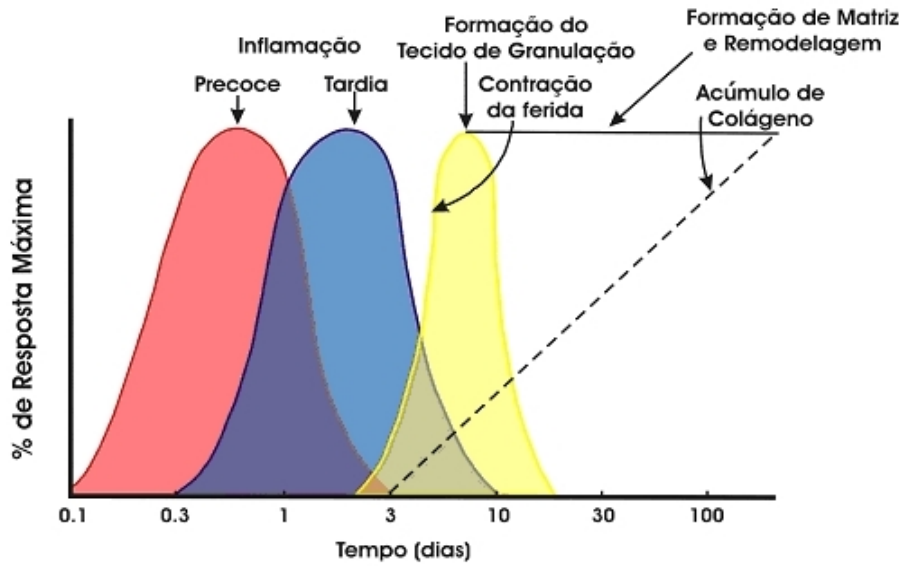


Figura 1 – Fases da cicatrização de feridas. A cicatrização de feridas é arbitrariamente dividida em três fases: inflamação (inicial e tardia), granulação tissular e remodelagem cicatricial. Esses acontecimentos são simultâneos e demonstrados ao longo das abscissas como uma função logarítmica de tempo[26]

Na fase inflamatória a hemostasia que ocorre logo após a lesão principia com a agregação plaquetária e formação de matriz provisória. Mediadores

inflamatórios são liberados durante a agregação plaquetária, atraindo neutrófilos e macrófagos à área lesada, além de fatores de crescimento e citocinas. Os neutrófilos ativados produzem enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases, que degradam o tecido necrótico e detritos da matriz extracelular. Essa degradação controlada permite a renovação da membrana basal, a migração e a proliferação celular, principalmente de fibroblastos.[20]

A fase seguinte é a proliferativa caracterizada pelo desenvolvimento do tecido de granulação, formado a partir do aumento do número de fibroblastos, da deposição de colágeno (fibroplasia) e da angiogênese. Os fibroblastos são células primordiais para a resolução da ferida, pois estão envolvidos na deposição de matriz extracelular e de sua remodelagem, na produção de fatores de crescimento e citocinas, na produção de metaloproteinases e seus inibidores, bem como na síntese de colágeno e de outras proteínas essenciais para construção da matriz extracelular.[27] Durante a fixação dos fibroblastos e seu amadurecimento fenotípico para células produtoras de colágeno, a contração da ferida atinge a sua eficiência máxima, graças à modificação de fenótipo de fibroblastos das margens para miofibroblastos.[28] Na continuação do processo de cicatrização, fatores de crescimento estimulam as células epidermais a proliferar e a se diferenciar (queratinizar), cobrindo o tecido de granulação com uma barreira celular protetora. [29]

Por fim, na fase de remodelagem, quando o leito da ferida já foi preenchido pelo tecido de granulação, lentamente esse tecido é enriquecido

com mais fibras colágenas. Surgem as fibras do tipo I em substituição às do tipo III, menos resistentes.[30] Com a evolução do processo, diminuem a alta densidade de novos vasos e miofibroblastos na cicatriz, as células endoteliais e fibroblastos entram em processo de apoptose.[31] A camada epidérmica hipertrófica torna-se mais fina. A remodelagem da cicatriz é lenta e envolve repetições de lise, ressíntese, redirecionamento e religação das fibras de colágeno, para aumentar a força tênsil sem, porém, atingir a regeneração completa.[29]

Todo esse processo requer uma regulação precisa, pois afeta uma variedade de funções celulares associadas à cicatrização da ferida.[24]

Na úlcera diabética ocorre uma ausência de ordenação destas fases, com manifestações anormais celulares e moleculares em todos os estágios da cicatrização.[32] Mais de uma centena fatores conhecidos contribuem para justificar a cronicidade das lesões em diabéticos. Isso inclui alterações na produção de fatores de crescimento, resposta angiogênica, função macrofágica, síntese e deposição de colágeno, quantidade de tecido de granulação, proliferação e migração de fibroblastos e queratinócitos, além de equilíbrio entre o acúmulo de componentes da matriz extracelular e sua remodelagem pelas metaloproteinases.[33]

Pesquisas clínicas e, principalmente experimentais, retrataram a complexidade envolvida no processo de cicatrização no DM.[10,20,34] A grande maioria das pesquisas sobre cicatrização é baseada em estudos com roedores,

que tem limitada semelhança com feridas em humanos.[35] Ainda existem poucos estudos que utilizaram células humanas provenientes de feridas em membros inferiores de pacientes diabéticos.[21]

As pesquisas que comprovaram alterações celulares e bioquímicas, a partir de experimentos realizados em culturas de fibroblastos derivados de úlceras em membros inferiores de indivíduos diabéticos, demonstraram baixa capacidade proliferativa, duplicação celular lânguida,[21] resposta mitogênica diminuída à estimulação por fatores de crescimento,[36] síntese reduzida tanto de fatores de crescimento quanto de colágenos e anormalidades morfológicas.[34]

Além das modificações citadas anteriormente observa-se que a contração da ferida que representa parte do processo de cicatrização, nesses pacientes, está reduzida ou ausente, provavelmente decorrente de defeitos na função do fibroblasto.[37] Ainda não há, na literatura mundial comprovação *in vitro* desse fenômeno.

Em 1979 Bell et al.[38] introduziram a matriz de colágeno povoada por fibroblastos como equivalente dérmico, cujo propósito seria a aplicação como enxerto de pele em pacientes queimados, porém tal proposta não teve êxito. Entretanto, o experimento tornou-se um valioso modelo para o estudo da contração de feridas, consagrado e adotado mundialmente até os dias atuais.[39,40] Nesse modelo tridimensional, fibroblastos em cultura povoam uma matriz de colágeno do tipo I. Inicialmente o fibroblasto recém adicionado à matriz de colágeno tem formato esférico, posteriormente torna-se alongado e

espraiado. A contração da matriz ocorre por eliminação de água entre as fibras colágenas, conduzindo a compactação das mesmas.[41] Desse modo, é possível avaliar a contração da matriz pelos fibroblastos.[38]

Se a compreensão da participação celular na cicatrização do diabético necessita de mais informações, igualmente importante é a necessidade de esclarecimentos sobre os mecanismos moleculares envolvidos no processo de cicatrização.

Pela compreensão dos mecanismos moleculares, novos tratamentos, bem como formas de prevenção, podem ser desenvolvidos, melhorando, inclusive, o entendimento sobre tratamentos atuais. Um dos recursos promissores na identificação de defeitos moleculares que gerem inibição crônica do processo de cura de feridas é a tecnologia de microarranjos de DNA.[42]

Atualmente os microarranjos de DNA (em inglês *DNA microarray*)[I], têm contribuído de forma relevante para o estudo da biologia celular. Essa tecnologia possibilita analisar simultaneamente a expressão de todo o transcriptoma celular, permitindo a identificação de perfis transcricionais associados ao(s) evento(s) estudado(s).[43]

[I] N. A.: A técnica de microarranjos de DNA foi desenvolvida há aproximadamente 30 anos. Seu nome e termos pertinentes têm sido utilizados internacionalmente grafados na língua inglesa. Por uma questão de compreensão adotaremos neste estudo a mesma forma de grafia, denominando, por exemplo, os microarranjos de DNA por *"DNA microarray".*

É possível mensurar modificações da expressão de genes em tecidos e células, identificando-se, assim, diferenças na fisiologia, estágio de desenvolvimento, patogênese, ou resposta a exposições ambientais.[43, 44]

A técnica de confecção do *DNA microarray* caracteriza-se pela utilização de uma lâmina de vidro sobre a qual estão imobilizadas quantidades ínfimas de transcritos de DNA (sonda ou *probe*), em posições precisamente definidas (pontos ou *spots*). Nessa lâmina os RNA mensageiros extraídos de tecidos ou células, previamente marcados com fluoróforos (fluorocromos), são hibridizados com as sondas. Após essa hibridização, a lâmina é lavada para remoção de artefatos que possam impedir sua leitura por raios laser. Ao passar sobre a lâmina os raios laser fazem com que os marcadores emitam luz (fluorescência). A leitura é feita por um escâner que capta a intensidade dessa fluorescência que representa a medida direta da atividade transcricional de um gene.[45]

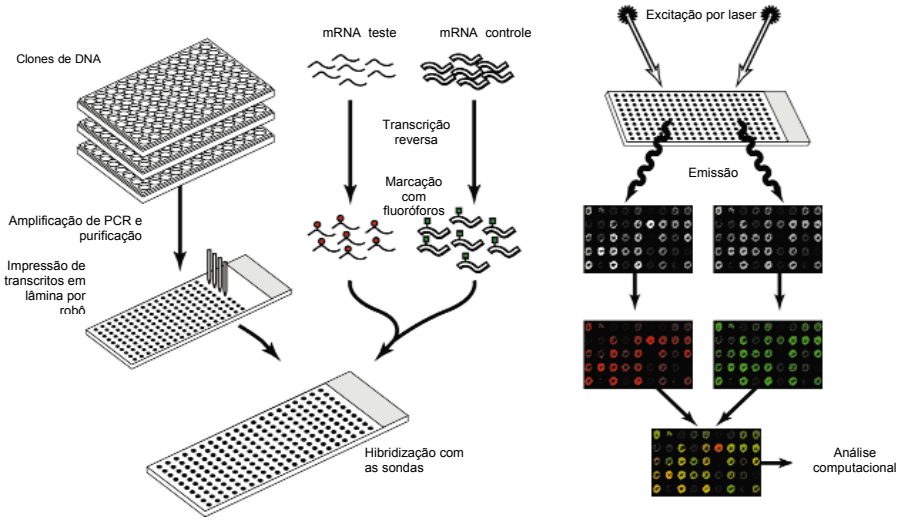


Figura 2 - Representação dos procedimentos realizados na técnica de microarray. Adaptado de Duggan et al.[46]

Atualmente existem, na literatura, estudos que mostram, por *microarray*, o perfil de expressão gênica da pele norma,l[47] ou de células cultivadas a partir da pele normal,[48] ou ainda, estudos do perfil da modulação de respostas celulares após exposição ou privação de uma substância.[49]

A análise por *microarray* de ulcerações em pele de etiologia vascular tem identificado a expressão de vários genes relacionados, diretamente ou não, ao processo de cicatrização[15,32,50] que podem ter papel fundamental na explicação da não resolução dessa ferida[51]. A possibilidade de detectar quais genes estão expressos de forma anômala no processo de cicatrização poderá contribuir para o desenvolvimento de terapias que regulem tais genes.

De acordo com Tomic-Canic et al.[42] no futuro próximo será possível diagnosticar um subtipo particular de ferida crônica pelo uso da tecnologia de *microarray* e, além disso, escolher o tratamento mais apropriado.

Já existem publicações que utilizam *microarray* como ferramenta para investigar alguns fenômenos relacionados aos tratamentos de feridas. Como exemplos, o uso dessa técnica como “guia” no desbridamento cirúrgico em feridas crônicas[23]; ou ainda, na verificação da modulação de metaloproteinases da matriz pelo TGF-β na cicatrização de feridas em pele irradiada[52]; ou na avaliação da modificação dos perfis de expressão gênica em feridas tratadas com terapia por pressão negativa.[53]

Apesar da ampla utilização do *microarray* para avaliar efeitos terapêuticos, um passo fundamental seria primeiro conhecer o perfil de expressão gênica das feridas crônicas, e assim determinar quais genes devem ser regulados, para o desenvolvimento de tratamentos assertivos. Todavia, embora a premissa seja coerente, ainda são inéditos, experimentos com alguns tipos de feridas que descrevam esse perfil, como é o caso da úlcera de membros inferiores em pacientes com DM.

Até o momento, não existem estudos sobre expressão gênica diferencial utilizando células provenientes de úlceras em pacientes diabéticos. Portanto, esperamos que os resultados deste trabalho elucidem pontos ainda desconhecidos na fisiopatologia dessa úlcera, e de tal sorte, possibilite promover a regulação destes genes, e até mesmo o desenvolvimento de novos tratamentos.

2. OBJETIVOS

Comparar *in vitro,* modificações no comportamento de fibroblastos derivados de feridas de membros inferiores de indivíduos diabéticos com fibroblastos oriundos de pele normal, quanto à proliferação celular e a capacidade de contração de modelo tridimensional de matriz de colágeno povoado por células;

Investigar o perfil de expressão gênica diferencial entre fibroblastos derivados de ferida de membro inferior de indivíduos diabéticos e de pele normal.

3. MÉTODOS

Nessa etapa estão apresentados os itens referentes à casuística, incluindo aspectos éticos e critérios de elegibilidade (inclusão e exclusão), e os itens referentes ao método, correspondentes a: obtenção e cultivo de fibroblastos, determinação dos grupos de estudo, proliferação celular, contração da matriz de colágeno, análise estatística e perfil de expressão gênica.

Casuística

3.1 Aspectos éticos

O estudo teve aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) sob o número 0360/08 (Anexo A).

Todos os pacientes inicialmente foram informados sobre o propósito e conseqüências do estudo, e a seguir obtivemos autorização destes pacientes mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

A pesquisa foi realizada nas dependências dos Laboratórios de Investigação Médica 04 e 36 da FMUSP – Laboratório de Pesquisa em Cultura de Células e Feridas da Cirurgia Plástica, e Laboratório de Genômica Pediátrica, respectivamente.

3.2 Critérios de Elegibilidade

Inclusão

Foram incluídos cinco pacientes adultos, atendidos no Ambulatório de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas, com diagnóstico de DM tipo 2, portadores de feridas crônicas em membros inferiores havia pelo menos seis meses, com tecido de granulação e sem infecção aparente que consentiram em participar do estudo.

Foram também incluídas cinco pacientes adultas do sexo feminino, não portadoras de DM, submetidas à cirurgia de mastoplastia com finalidade estética, cujo excedente de pele foi doado ao Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clinicas (ICHC) da FMUSP com propósito de pesquisa.

Exclusão

Foram excluídos pacientes com distúrbios de coagulação, portadores de feridas em fase de epitelização e/ou com área mínima de tecido de granulação, com feridas infectadas ou com probabilidade de infecção.

Método

3.3 Obtenção e cultivo de fibroblastos

Fibroblastos normais foram obtidos a partir de excedentes de pele normal doados ao Banco de Tecidos do IC-HCFMUSP.

Fibroblastos oriundos de feridas de membro inferior foram obtidos por biópsia, de aproximadamente quatro milímetros de diâmetro, no tecido de granulação do leito da ferida. Essas intervenções cirúrgicas foram realizadas por médicos, pertencentes a equipe de cirurgia plástica do HCFMUSP, após a limpeza da ferida com NaCl a 0,9%, durante curativos cirúrgicos.

Após a remoção dos fragmentos de tecido, o material foi armazenado para transporte em solução de DMEM, acrescido de penicilina (200 U/mL), estreptomicina (200 μg/mL), gentamicina (80 μg/mL) e anfotericina B (50 μg/mL).[54]

Em cabine de fluxo laminar, imediatamente, o material foi descontaminado. Primeiramente os fragmentos de tecidos foram lavados em solução fisiológica por alguns segundos, a seguir, desinfetados em etanol a 70 % por 15 segundos, e por último, enxaguados por duas vezes em solução fisiológica e uma terceira vez em solução fisiológica acrescida de penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 μg/mL), gentamicina (40 μg/mL) e anfotericina B (25 μg/mL).[54]

Fibroblastos foram isolados segundo a técnica de explante proposta por Carrel[55], a saber: as amostras de tecido foram cortadas em 25 fragmentos de 1 mm^2 e depositadas em frascos de 25 cm^2 contendo meio de cultura para fibroblastos Dulbecco Modificado por Eagle (DMEM) acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF) com estreptomicina 100 μg/mL, penicilina 100 UI/mL, anfotericina B 0,25 μg /mL e L-Glutamina 1%.

Os frascos foram mantidos em incubadora a 37 ^oC em atmosfera de 5% de CO_2. O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas até que um número suficiente de células migrasse do fragmento de tecido e aderisse ao fundo das garrafas de cultura, formando aspecto de subconfluência celular (ao redor de cada fragmento). Nesse momento os fragmentos dermoepidérmicos foram descartados da superfície de cultura das garrafas, e realizada amplificação das culturas. Para tal procedimento adicionou-se 5 mL de solução de tripsina 0,05% + EDTA 0,02%. As garrafas foram mantidas por 5 minutos em incubadora a 37 ºC e atmosfera de 5% de CO_2, até o destacamento das células do fundo das garrafas. Essa reação enzimática foi interrompida pela adição de 5 mL de DMEM + SBF 10%. O conteúdo foi transferido para um tubo de fundo cônico e centrifugado durante 5 minutos a 302 x g. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram ressuspendidas em DMEM + SBF 10% e transferidas para garrafas de cultura de células de 75 cm^2 de área e incubadas novamente a 37 ºC e atmosfera de 5% de CO_2. A cada 72 horas, o meio de cultura foi trocado. Amplificações similares foram realizadas sempre que as células

formavam aspecto de subconfluência (aproximadamente 70% das células apresentavam aspecto de confluência).

As células foram contadas em hemocitômetro a cada amplificação, e quando um número suficiente era obtido, as células eram congeladas para utilização posterior. Para o congelamento, aproximadamente 1×10^{6} células foram transferidas para criotubos de 2 mL e acrescentado 1 mL de solução de congelamento, a saber: 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) + 30% SBF + 60% de meio de cultura. Esses criotubos foram estocados 24 horas em recipiente para congelamento em *freezer* a -80 ºC e depois transferidos para contêiner com nitrogênio líquido.

Fragmentos de pele que apresentaram contaminação ou ausência de proliferação celular foram excluídos do estudo. Todos os experimentos foram realizados entre a terceira e a quinta amplificação.

3.4 Determinação dos grupos de estudo

Fibroblastos cultivados a partir de pele normal de cinco indivíduos não-diabéticos receberam a denominação de FC (fibroblastos controle); enquanto fibroblastos provenientes de amostras de tecidos de membros inferiores de cinco indivíduos diabéticos foram denominados de FFD (fibroblastos de ferida diabética).

3.5 Proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada desde a migração das primeiras células após o explante (por um período de 27 dias).

Os momentos determinados para quantificação das células foram 7, 11, 14, 17, 21, 24 e 27 dias. Cada amostra de tecido foi semeada em dois frascos (A e B) de cultura de célula.

Em cada momento uma das garrafas A ou B foi submetida à soltura das células, para contagem dos fibroblastos em câmara hemocitométrica de modo que o intervalo de amplificação das culturas foi de aproximadamente sete dias. Para a contagem das células, utilizou-se procedimento semelhante ao da amplificação para a soltura das células do fundo das garrafas.

3.6 - Contração da matriz de colágeno

Modelo de contração de matriz extracelular povoada por fibroblastos

O modelo de contração de matriz extracelular experimental por nós utilizado foi aquele adotado por Kamamoto, et al.[40] e Isaac.[26]

A matriz extracelular de colágeno foi elaborada no LIM 04 da FMUSP, utilizando-se solução de colágeno tipo I, obtido de tendão de cauda de rato. Em placas de 24 poços (área de 1,96 cm^2/poço), no momento da confecção do modelo foram combinados em cada poço: 100 µL PBS (10 x concentrado); 100

µL NaOH 0,1 M; ~ $4x10^5$ células (suspensas em 400 µL de PBS 1 x concentrado) e 400 µL de solução de colágeno 1,21 mg/mL. Ao final da adição de cada item, a solução era homogeneizada. As placas multipoços foram mantidas em incubadora a 37 ºC e atmosfera de 5% de CO_2, aguardando-se a formação a gelificação durante 12 horas. Uma vez ocorrida a formação da matriz extracelular, foi adicionado 1 mL de meio de cultura para fibroblastos. As matrizes foram então, gentilmente, desprendidas das paredes e leito dos poços de cultura e as placas multipoços foram armazenadas novamente em incubadora a 37 ºC e atmosfera de 5% de CO_2. As matrizes contendo fibroblastos foram acompanhadas e avaliadas a partir de 12h até sete dias de seu descolamento dos poços de cultura. A área do gel de colágeno povoado por fibroblastos foi fotografada nos momentos 12, 24, 36, 48, 96 horas e 7º dia, com câmera fotográfica digital (*Nikon Coolpix 2200, 2.0 megapixels*). A medida da área do gel foi realizada utilizando-se o programa para processamento e análise de imagem UTHSCSA *Image Tool for Windows* versão 3.0 (disponível em http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.html). A leitura foi realizada em triplicata e o valor utilizado como resultado foi a média aritmética das triplicatas.

3.7 - Análise estatística dos ensaios de proliferação e contração da matriz de colágeno

Para as variáveis quantitativas de proliferação celular e contração da matriz de colágeno foram calculados medidas resumo (média, desvio e erro padrão), além da construção de gráficos de perfil de médias.

Para comparação dos grupos FFD e FC ao longo do tempo, utilizou-se o modelo de Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas, e adoção de nível de significância de 5%.

3.8 - Perfil de Expressão Gênica (*DNA Microarray*)

Os ensaios para análise do perfil de expressão gênica foram realizados no Laboratório de Genômica Pediátrica do LIM 36 da FMUSP com a técnica de *DNA microarray*, como descreveremos a seguir.

3.8.1 - Extração do RNA total

Para extração do RNA de fibroblastos foram utilizados aproximadamente 1×10^6 células de cada amostra.

As células congeladas em nitrogênio líquido foram descongeladas em "banho-maria" a 37 ºC, em seguida foi adicionado, 0,5 mL de solução (90% DMEM + 10% SBF) e homogeneizado. Acrescentou-se outros 5 mL da mesma

solução e centrifugou-se por 5 minutos à 302 X g. As células precipitadas foram ressuspendidas em NaCl 0,9% e outra vez, centrifugadas por 5 minutos a 302 X g, descartando-se o sobrenadante.

Na extração do RNA total das amostras de fibroblastos utilizou-se o *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen* cod.74104), segundo as instruções do fabricante. Cujo processo resumidamente consiste em lise da membrana celular pela adição de solução tampão, filtração em colunas providas de micro filtros para retenção dos detritos do lisado e centrifugações, até a obtenção do RNA.

Uma vez extraído o RNA, prosseguiu-se o experimento com a verificação da quantidade deste RNA por leitura da absorbância a 260 e 280 nm em espectrofotômetro modelo *NanoVue* (GE Health care). As amostras foram conservadas em *freezer* a -80 ºC até que houvesse a avaliação da integridade do RNA extraído.

No momento de verificação dos níveis de integridade do RNA ribossomais 18 e 28S, todas as amostras foram descongeladas e analisadas em aparelho bioanalisador, *Bioanalyzer 2100 (*Agilent Technologies).

3.8.2 - Análise da Qualidade do RNA

Concentração, pureza e integridade das amostras foram determinadas por análises de eletroforese capilar obtidas com a plataforma (*microfluidics-based platfform*) Bioanalyzer 2100 (RNA Lab Chip, Agilent Technologies), cujas

bandas correspondentes aos RNA ribossomais 18 e 28S deveriam estar bem nítidas e íntegras como exemplifica a figura 3. O bioanalisador usa como referência o cromatograma e as bandas resultantes para atribuir uma nota (RIN, RNA Integrity Number) às amostras, que varia de 0-10 de acordo com sua integridade (a nota 10 indica RNA 100% íntegro).

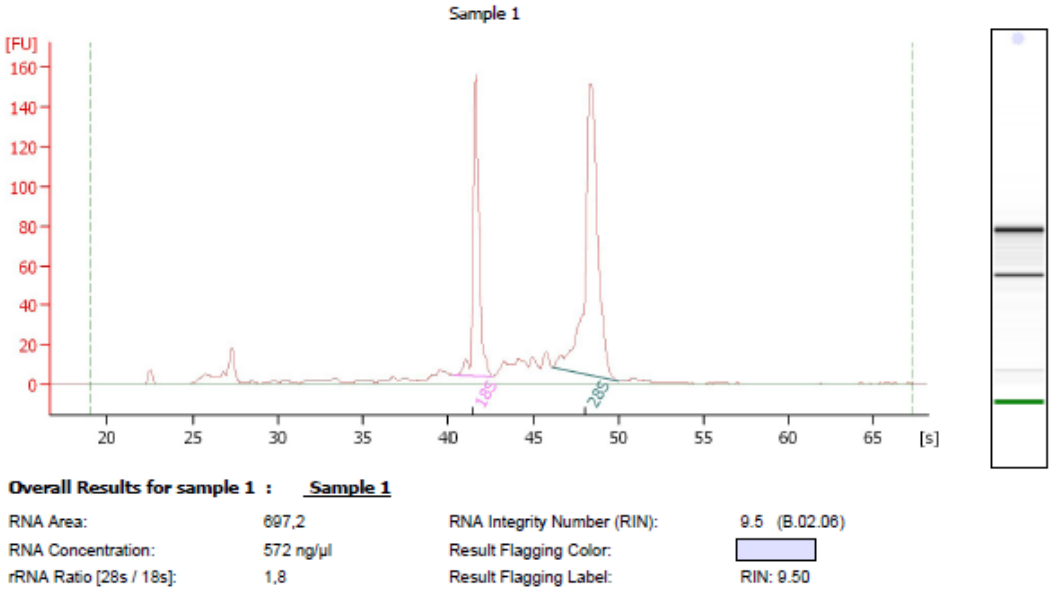


Figura 3 – Exemplo de eletroferograma de RNA de boa qualidade com dois picos nas bandas 28S e 18S

Para análise do RNA, seguiu-se protocolo com recomendações do fabricante (Agilent RNA 6000 Nano Kit) para manipulação e preparo do *chip* de separação em eletroforese em gel, introdução dos marcadores de tamanho,

amostras e corantes. Em cada reservatório indicado na microplaca (*microchip*), foi aplicado o gel de poliacrilamida com intercalador fluorescente, o marcador de corrida, adicionados à amostra e ao padrão de tamanho de corrida. O *microchip* foi introduzido no equipamento, que contém um detector de fluorescência induzida a laser. O tempo de análise para 12 amostras foi de aproximadamente 30 minutos entre a preparação, a aplicação de amostra, a análise e a coleta dos dados.

3.8.3 - Hibridização e análise da expressão gênica

Os experimentos de hibridização, para análise de expressão gênica, foram realizados com a plataforma *Agilent Technologies* (GE Healthcare). Esta plataforma utiliza bioarranjos confeccionados com oligonucleotídeos de 60 bases, individualmente pré-validados. Para análises do perfil de expressão gênica, foram utilizadas lâminas de microarranjos contendo 44.000 transcritos de genes humanos, correspondente a 23.000 genes (Agilent Technologies). Os procedimentos de hibridização seguiram estritamente os protocolos fornecidos pelo fabricante. As imagens foram capturadas pelo leitor *Agilent Bundle* de acordo com os parâmetros recomendados para *Agilent bioarrays* e extraídos pelo *programa Feature Extraction* versão 9.5.3.

Os sinais gerados pela hibridização dos cDNAs das amostras (marcadas com o fluorocromo Cy3) com as seqüências fixadas nas lâminas de vidro foram capturadas pelo escâner. O leitor localiza pontos de hibridização e obtém dados

correspondentes aos sinais de fluorescência emitidos pela amostra hibridizada com o material da lâmina, quando o fluorocromo é excitado pelo laser emitido pelo sistema. O sistema quantifica o sinal a partir da conversão da luz emitida pelo fluorocromo excitado em energia elétrica, produzindo um sinal mensurável.

A qualidade das lâminas foi avaliada pela análise de correlação entre a quantidade de pontos e a intensidade destes utilizando o programa R versão 2.9.2 (*R Development Core Team, 2009*), que consiste em uma ferramenta computacional para cálculos estatísticos e análise gráfica.

3.8.4 - Análise de bioinformática dos dados

Após aquisição das imagens das lâminas, foi obtida uma gama de informações fornecidas pelo programa de computação MeV (*Multiexperiment Viewer*).

Inicialmente, os dados foram analisados quanto à sua reprodutibilidade por meio do coeficiente de variação. Após esta avaliação, foi feita a normalização dos dados dispostos numa curva, objetivando excluir variações ocorridas durante a técnica de *DNA microarray*.

Para analisar os genes diferencialmente expressos, utilizou-se o programa SAM *(Significance Analyses of Microarray*) disponível em http://www.stat.stanford.edu~tibs/SAM/ que baseia suas análises estatísticas em uma série de testes-t específicos para cada gene, adaptados para a

detecção em larga escala de genes diferencialmente expressos. Níveis de expressão além de determinado limite são designados como genes com resposta diferencial potencialmente significativa. O SAM também calcula o valor de *Fold Change*,[II] ou seja, a razão proveniente da divisão do valor obtido no experimento estudo (FFD) pelo valor do experimento controle (FC) de um gene. O valor de *Fold,* ou o número de vezes que o gene aparece diferencialmente expresso em relação ao seu controle, estabelecido para o estudo foi ≥ 2.

Os resultados obtidos foram então categorizados de acordo com o GO (*Gene Ontology Consortium* - http://www.geneontology.org) um banco de dados que disponibiliza informações de genes cujas descrições (anotações) estão ali depositadas. A utilização do banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - http://www.genome.jp/kegg) permitiu a identificação das vias metabólicas das quais os genes participavam.

3.8.5 - Análise da Interação Transcricional

Para análise dos genes diferencialmente expressos utilizou-se ainda o aplicativo de computação FunNet (http://www.funnet.info), que apresenta graficamente redes de interações transcricionais. Esse aplicativo permite a identificação de um conjunto significante de temas biológicos que caracterizam os transcritos analisados (processos celulares, vias, funções moleculares).[56]

[II] Este termo é correntemente utilizado em sua forma inglesa, não possuindo correspondência para o português.

3.8.6 - Confirmação dos dados de microarranjo por PCR em tempo real

Os dados de expressão diferencial dos genes foram validados por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (*real-time quantitative polymerase chain reaction* – qPCR). As análises foram realizadas conforme a metodologia SYBR Green, de acordo com as recomendações do fabricante (*Quantitec SYBR Green PCR kit*).

Todas as amostras foram amplificadas em triplicata. Reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 1X *SYBR Green mix*, 10 picomol de cada *primer* e 2 µL de cDNA (diluição de 1:10, sintetizado de 1 µg de RNA total). Amplificações do qPCR foram realizadas em aparelho *Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System* com o programa SDS versão 1.4 (*Applied Biosystems*). Os parâmetros ajustados foram: aquecimento inicial de 95 ºC por 15 minutos seguidos por 45 ciclos de 95 ºC por 15 segundos e 61 ºC por 30 segundos.

Para normalizar as reações de qPCR, o Gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase (GAPDH) foi incluído como gene de referência. A expressão relativa foi determinada pelo método de curva padrão relativa e expresso como *fold change*.

Os *Primers* ou iniciadores de replicação de DNA específicos para oito genes (Tabela 1) foram desenhados utilizando o programa *Primer3 Input 0.4.0* (disponível em http://frodo.wi.mit.edu/primer3/).

Tabela 1 – Seqüência dos *primers* utilizados nos experimentos de qPCR para os genes selecionados a partir dos resultados do *DNA microarray* e seus respectivos tamanhos de fragmentos gerados em pares de base (pb)

Gene	**Seqüência (5´→3´)**	**Tamanho (pb)**
BMP4	ccctgagaacgaggtgatct gcagggctcacatcaaaagt	219
GLI2	tggaatttggaactggcttc cctcattaaggccaaggtca	210
PAX9	ctggagcaggaagccaagta tcacagttgtggggagacaa	203
HOXB2	gccaggattcacctttcctt accgggaggaggaaacag	198
FGF7	ggctaacaatttggaaagagca gtagagcaaagttggcagga	191
COL3A1	gatcaggccagtggaaatgt gatcaggaccaccaatgtca	223
KIT	actgtggccgttatctggaa caatgaagtgcccctgaagt	217
VDR	aggagctgggaggaaaagaa ctgtctctgggaatcttgtgg	199

4. RESULTADOS

4.1 – Cultura de fibroblastos

No grupo FFD, a cultura dos fibroblastos foi de difícil realização. As dificuldades, por nós enfrentadas ocorreram desde a obtenção de células por déficit de migração, até o desprendimento espontâneo das células já aderidas às superfícies de cultivo dos frascos ou contaminação bacteriana da cultura. Além disso, algumas amostras resultaram em quantidades ínfimas e insuficientes de células.

O aspecto morfológico das células FFD diferiu muito do grupo FC. À microscopia de luz invertida, os fibroblastos aparentavam-se senescentes desde a migração, com citoplasmas espalhados, translúcidos e repletos de vacúolos (Figura 4A).

No grupo FC, fibroblastos migraram do fragmento de pele e aderiram à superfície dos frascos de cultura, apresentando aspecto morfológico compatível com a normalidade (Figura 4B). Não foi encontrada qualquer dificuldade na manutenção destas culturas.

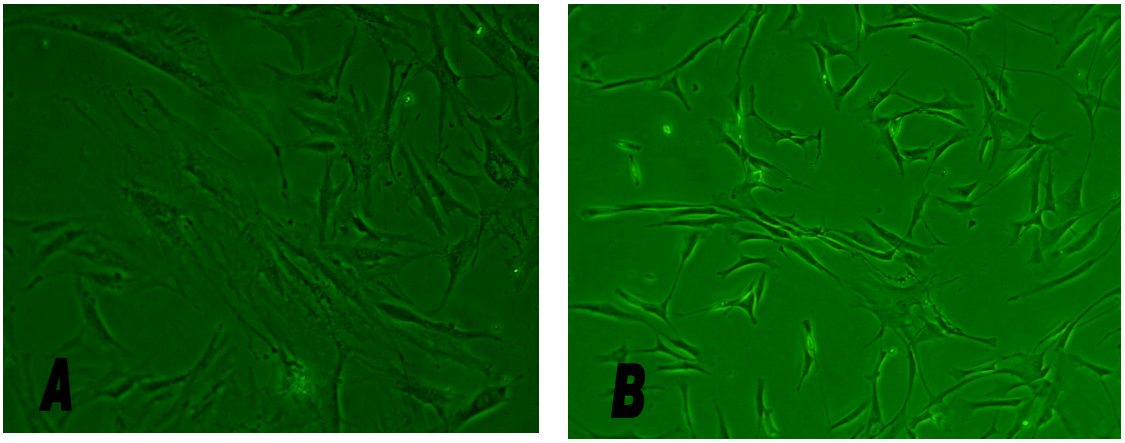


Figura 4 - Fibroblastos em frascos de cultura. Na Figura 4A: fibroblastos humanos derivados de ferida de membro inferior de diabético (MO 100x); Figura 4B: fibroblastos humanos normais (MO 100x).

4.2 – Proliferação celular

O número de fibroblastos ao longo dos 27 dias analisados aumentou significativamente para os dois grupos (p=0,008).

A comparação da proliferação celular entre os grupos FC e FFD não demonstrou diferença estatisticamente significante durante o período (p=0,113). A despeito de a análise estatística indicar ausência na diferença em número de fibroblastos entre os grupos, verificou-se uma tendência a elevação na curva de proliferação celular após o vigésimo primeiro dia no grupo FC (Figura 5).

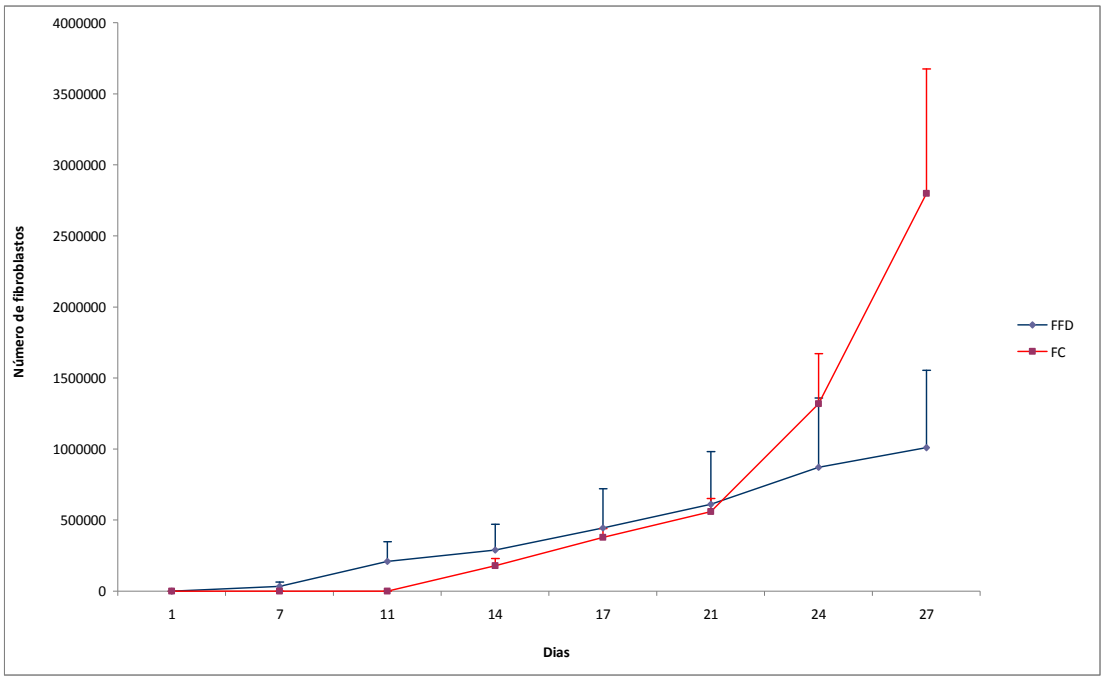


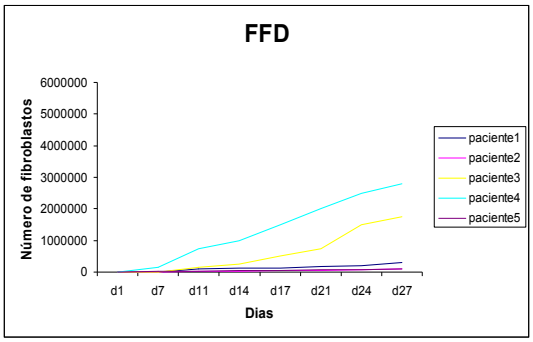
Figura 5 – Curvas de proliferação celular de FFD e FC nos dias 1, 7, 11, 14 17, 21, 24 e 27

O resultado da análise dos dados de proliferação indicou similaridade nos dois grupos. A heterogeneidade na proliferação individual dos grupos resultou em grande dispersão no erro padrão da média (Tabela 2).

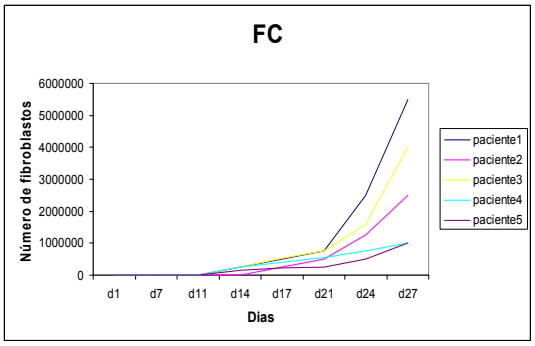
Tabela 2 – Dados de proliferação de fibroblastos dos grupos FFD e FC ($\bar{x}$=média, EP=erro padrão)

Dias	1	7	11	14	17	21	24	27
$\bar{x}$ FFD	0	34000	210600	288800	445000	611300	871600	1010000
							132000	
$\bar{x}$ FC	0	0	0	180000	378200	560000	0	2800000
EP FFD	0	29257	136914	181934	276632	369689	487549	543691
EP FC	0	0	0	48990	61304	92736	351639	874643

Quanto à análise individual das curvas de proliferação celular (Figura 6) pudemos observar que na Figura 6A, dois indivíduos (pacientes 3 e 4) apresentaram evolução muito diferente do restante do grupo, ocasionando grande variação da amostra e interferindo na comparação com o grupo controle. Na Figura 6B, apesar de haver alguma variabilidade individual existe uma tendência a homogeneidade no grupo.



A



B

Figura 6 - Curva de proliferação celular por pacientes nos dias 1, 7, 11, 14 17, 21, 24 e 27. Figura 6A - Grupo FFD e Figura 6B - Grupo FC

4.3 – Contração da matriz de colágeno

No início do experimento as matrizes de colágeno dos grupos FFD e FC apresentavam área igual ao do poço de cultura, ou seja, 1,96 cm^2. A partir de 12 horas, foi verificada redução progressiva dessas áreas, e assim sucessivamente até o sétimo dia de avaliação conforme descrito na Tabela 3. No sétimo dia o grupo FFD apresentou contração do gel de 1,51 $\pm$ 0,02 cm^2, o que corresponde à redução de 23% da área original.

A contração do gel do grupo FC foi maior no mesmo tempo analisado, resultando em uma área de 1,37 $\pm$ 0,02, ou seja, redução de 30% da área original.

Tabela 3 – Dados da contração de matriz de colágeno povoada por fibroblastos para os grupos FFD e FC ($\bar{x}$=média, DP= desvio padrão, EP=erro padrão)

Períodos	**12h**	**24h**	**36h**	**48h**	**96h**	**7d**
$\bar{x}$ FFD (cm^2)	1,72	1,61	1,56	1,56	1,53	1,51
$\bar{x}$ FC (cm^2)	1,64	1,46	1,44	1,41	1,39	1,37
DP FFD	0,05	0,04	0,01	0,05	0,06	0,02
DP FC	0,04	0,07	0,03	0,05	0,05	0,02
EP FFD	0,02	0,02	0,00	0,02	0,03	0,01
EP FC	0,02	0,03	0,01	0,02	0,02	0,01

Na Figura 7 é possível avaliar a capacidade de contração da matriz de colágeno no intervalo de tempo determinado. Ambos os grupos apresentaram performance semelhante. Isto quer dizer, que a partir da 0h até o sétimo dia, houve redução significativa da área da matriz para os grupos FFD e FC (p<0,001).

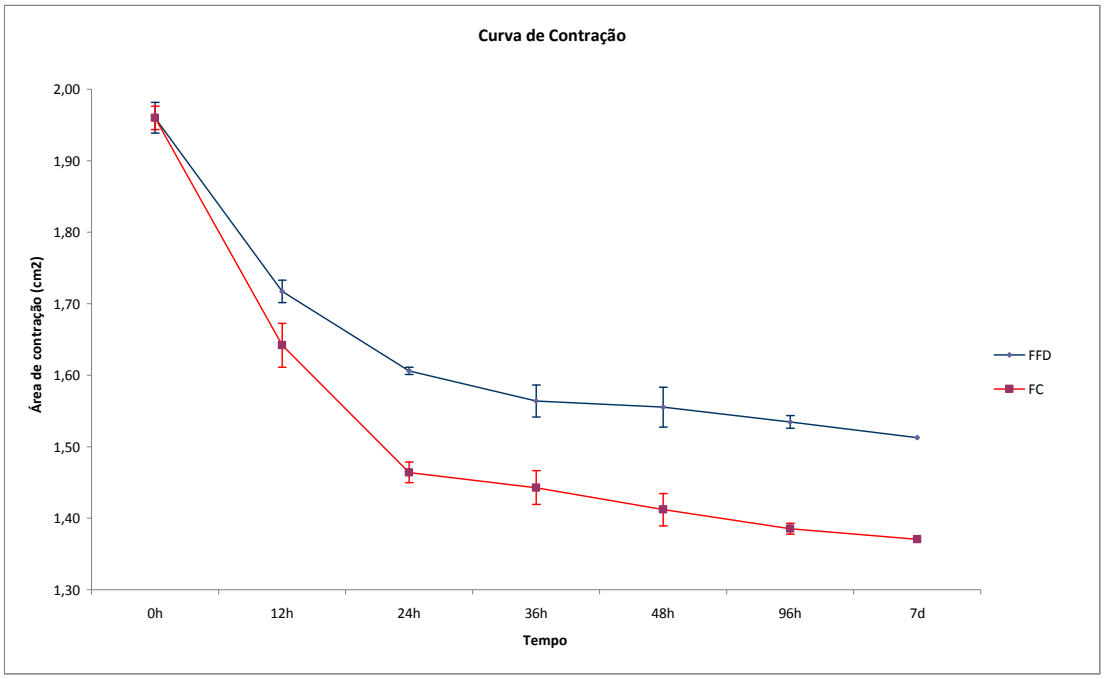


Figura 7 – Contração da matriz de colágeno pelos grupos FFD e FC nos momentos de 12, 24, 36, 48, 96 horas e 7 dias (p<0,001).

Entre os grupos também houve diferença estatisticamente significante na capacidade de contração da matriz de colágeno. O grupo FC apresentou menor área do gel e, portanto, maior contração, comparado ao grupo FFD (p<0,001).

4.4 – Perfil de expressão gênica

4.4.1 - Quantificação e controle de qualidade do RNA extraído

A qualidade da preparação do RNA extraído foi avaliada pela concentração, pureza, e verificação dos níveis de integridade do RNA ribossomais 18s e 28s (Figura 8).

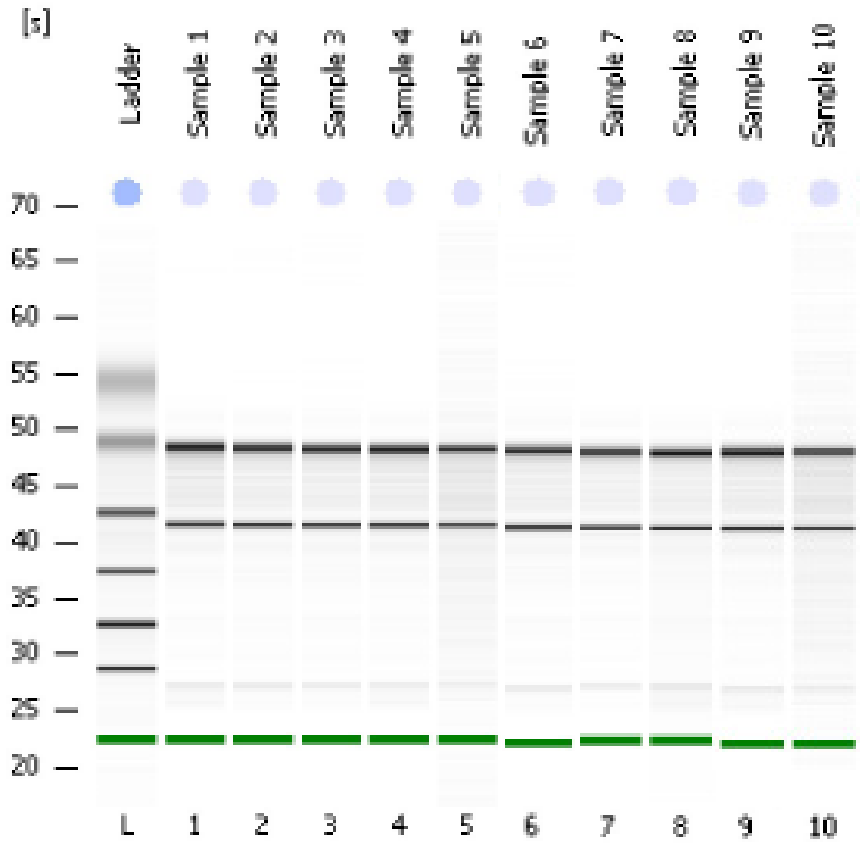


Figura 8 – Eletroforese dos RNAs (FC= sample 1 -5 e FFD=sample 6-10), evidenciando a integridade das bandas referentes às subunidades 28s e 18s do RNA ribossomal

Foram consideradas ótimas amostras em concentração e pureza de RNA, aquelas com níveis de 200 a 1000 ng/mL, relação de absorção (A260/280) entre 1,8 e 2,0, número de integridade do RNA (RIN) de 7 a 10 (70 a 100%) e proporção RNAr (RNA ribossômico) 28s / 18s próximo de 1,8 (Tabela 4).

Tabela 4 – Quantificação e controle de qualidade das amostras de RNA total dos grupos FC e FFD

Amostra	Concentração de RNA (ng/mL)	Relação A260/280	Rendimento (μg/mL)	RIN	Proporção RNAr 28s/18s
1*	572	2,08	903,6	9,5	1,8
2*	307	2,09	861,2	9,4	1,6
3*	255	2,09	543,2	9,4	1,5
4*	391	2,09	569,2	9,4	1,7
5*	379	2,07	400	9,3	1,8
6#	24	2,1	32,8	8,2	1,7
7#	277	2,09	418	9,6	1,6
8#	271	2,08	788,8	9,2	1,8
9#	485	2,08	544,4	9,6	1,8
10#	471	2,09	428,8	9,5	1,8

* - FC e #- FFD

4.4.2 – Análise de bioinformática dos dados

Para análise do perfil transcricional foram identificados 23.880 transcritos válidos utilizando o aplicativo estatístico “R”. Foram selecionados transcritos diferencialmente expressos na comparação entre os grupos FFD e FC, com base em teste-t permutado (ajuste de Bonferroni, p valor $\leq$ 0.01) e *Fold* de ±2. Os dados foram submetidos ainda, a análise pelo aplicativo SAM, que revelou 143 genes diferencialmente expressos de fibroblastos derivados de úlcera de membro inferior em indivíduo diabético comparado com fibroblastos de indivíduos sem úlcera e sem diabetes. Desse total 21 genes não possuem anotação, portanto foram excluídos das análises e oito genes foram expressos sob duas isoformas. Dos 114 genes apenas 10 genes foram hiperexpressos, enquanto 104 foram hipoexpressos (Tabela 5).

Tabela 5 – Íntegra dos 143 genes diferencialmente expressos de fibroblastos de úlcera de membro inferior de indivíduo diabético em relação a fibroblastos de indivíduo sem úlcera e sem diabetes

Nome	GeneID	Fold change	Hiperexpressão	Hipoexpressão
KRTAP1-5	83895	3,256,734,204	X	
TTTY14	83869	1,817,099,397	X	
PLEKHG4B	153478	1,712,050,557	X	
C9orf109	286333	1,216,979,118	X	
BMP4	652	734,314,533	X	
SLC4A1	6521	711,364,485	X	
PAX9	5083	642,683,886	X	
NPAS1	4861	568,201,316	X	
STEAP3	55240	476,253,132	X	
GLI2*	2736	377,843,041	X	
GLI2*	2736	341,457,242	X	
PSG5	5673	-2,210,202		X

"continua"

Nome	GeneID	Fold change	Hiperexpressão	Hipoexpressão
DTWD1	56986	-2,826,379		X
PBX1*	5087	-4,752,087		X
IGF1R	3480	-20,933,377		X
MESDC1	59274	-21,979,891		X
STK3	6788	-22,438,427		X
TMEM135	65084	-23,703,294		X
MYC	4609	-24,247,994		X
PNPLA7	375775	-24,569,181		X
SMPDL3A	10924	-24,573,069		X
RSRC1	51319	-24,687,463		X
SLC25A23*	79085	-28,843,118		X
PSG3	5671	-29,085,752		X
SHOX2*	6474	-29,640,874		X
PHLDB3	múltiplos genes	-30,295,346		X
EHBP1	23301	-31,151,024		X
ZFP36	7538	-34,254,347		X
APOL3*	80833	-38,875,933		X
COL3A1*	1281	-48,465,777		X
FIBIN	387758	-85,849,507		X
PTPRA	5786	-163,998,653		X
ZNF280D	54816	-175,610,964		X
ZBTB34	403341	-180,951,078		X
PELI3	246330	-187,133,783		X
OMA1	115209	-188,006,278		X
ZNF333	84449	-190,505,716		X
ANKRD28	23243	-201,799,528		X
TRAF5	7188	-218,187,961		X
ZNF503	84858	-226,276,349		X
ATXN1	6310	-230,302,675		X
TMEM140	55281	-230,568,494		X
IFIT1	3434	-236,650,587		X
ANO6	196527	-239,277,825		X
RELL1	768211	-240,109,827		X
TMEM135	65084	-242,123,098		X
LDLR	3949	-242,488,137		X
CEBPB	1051	-244,359,558		X
NCK1	4690	-246,546,147		X
PPP1R3B	79660	-247,171,282		X
ASAH1	427	-259,054,079		X
DNMT3B	1789	-260,783,399		X
CYBRD1	79901	-261,323,578		X
TMEM47	83604	-262,779,682		X
NKIRAS1	28512	-270,260,712		X
CHURC1	91612	-271,321,419		X
VDR	7421	-271,458,959		X

"continua"

Nome	GeneID	Fold change	Hiperexpressão	Hipoexpressão
PPAP2A	8611	-273,061,421		X
TMTC4	84899	-275,315,174		X
BMP2K*	55589	-275,508,559		X
SHOX2*	6474	-279,062,192		X
IFIH1	64135	-281,160,327		X
VAMP4	8674	-282,608,064		X
TNFRSF14	8764	-285,135,783		X
KLF11	8462	-290,301,119		X
DNM3	26052	-292,142,603		X
SLC25A23*	79085	-300,862,299		X
RAB9A	9367	-304,053,581		X
EHBP1	23301	-306,616,772		X
CDC14B	8555	-307,870,377		X
HOXC8*	3224	-307,938,251		X
GUCY1B3	2983	-314,419,375		X
SRPX2	27286	-315,339,107		X
DTX3L	151636	-327,420,498		X
PIM3	415116	-331,846,195		X
CLIC2	1193	-355,533,176		X
LGALS3BP	3959	-366,526,671		X
FAP	2191	-370,094,044		X
APOL3*	80833	-378,652,269		X
TPST1	8460	-383,289,821		X
RENBP	5973	-389,699,824		X
PAG1	55824	-402,664,487		X
FAM134B	54463	-416,558,545		X
COL3A1*	1281	-420,476,178		X
PLD1	5337	-436,401,567		X
TRIM7	81786	-440,116,978		X
DPP4	1803	-460,127,952		X
LAMA4	3910	-506,756,235		X
PBX1*	5087	-507,235,523		X
MAOA	4128	-508,494,851		X
ATP2A3	489	-537,050,609		X
HOXA10	3206	-539,559,938		X
KCNK2	3776	-563,027,094		X
LRP4	4038	-585,628,555		X
MEIS1	4211	-587,827,179		X
SYNPO2	171024	-608,321,975		X
HOXC9	3225	-618,508,755		X
NR4A3	8013	-646,336,329		X
LMCD1	29995	-646,801,302		X
FGF7	2252	-748,523,209		X
SGCA	6442	-761,171,978		X
LRRC15	131578	-884,124,547		X
IFI27	3429	-884,995,314		X

"conclusão"

Nome	GeneID	Fold change	Hiperexpressão	Hipoexpressão
DDIT4L	115265	-895,690,559		X
KIT	3815	-925,286,623		X
PSG4	5672	-1,410,930,559		X
ASPA	443	-1,424,234,816		X
CLDN11	5010	-1,518,083,527		X
IFI27	3429	-1,532,578,801		X
RSPO3	84870	-1,645,103,149		X
PSG11	5680	-1,731,640,508		X
PSG9	5678	-1,740,009,237		X
STXBP6	29091	-1,938,656,996		X
HOXC8*	3224	-2,249,622,775		X
MBP	4155	-2,571,629,811		X
CCDC85A	114800	-2,641,485,283		X
DPT	1805	-2,935,055,272		X
PITX2	5308	-3,262,190,483		X
PSG2	5670	-3,370,314,849		X
STXBP6	29091	-3,411,242,707		X
HOXB2	3212	-3,939,804,489		X

* Genes que expressaram mais de uma isoforma.

Também foi gerado o agrupamento hierárquico não supervisionado, pelo programa MeV (Figura 9).

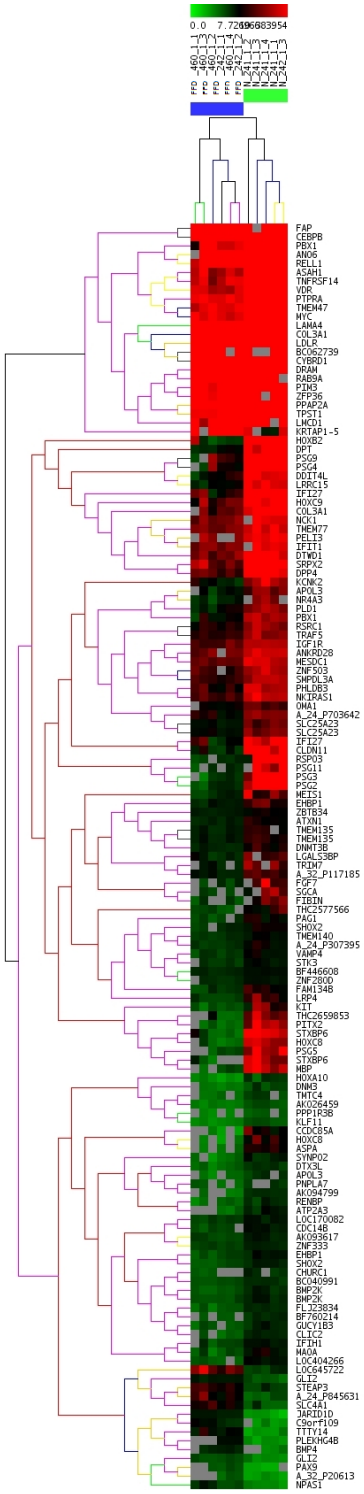


Figura 9 – Agrupamento hierárquico não supervisionado dos grupos de fibroblastos derivados de úlcera de membro inferior de indivíduos diabéticos (FFD) e de pele normal (FC). As variações de cores representam em verde os genes hipoexpressos e em vermelho os genes hiperexpressos

4.4.3 – Ontologias gênicas

Ontologias gênicas (Processo Biológico, Componente Celular e Função Molecular) que caracterizam o perfil gênico funcional de fibroblastos derivados de úlcera de membro inferior de diabético comparado aos fibroblastos controle. Cada ontologia apresenta categorias hiperexpressas (representadas em vermelho) ou hipoexpressas (representadas em verde) conforme os papéis biológicos anotados em GO ou KEGG dos genes analisados (Figuras 10, 11 e 12).

A figura 10 representa a ontologia de Processo Biológico, que contempla igualmente 12 categorias de transcritos hiperexpressos e hipoexpressos.

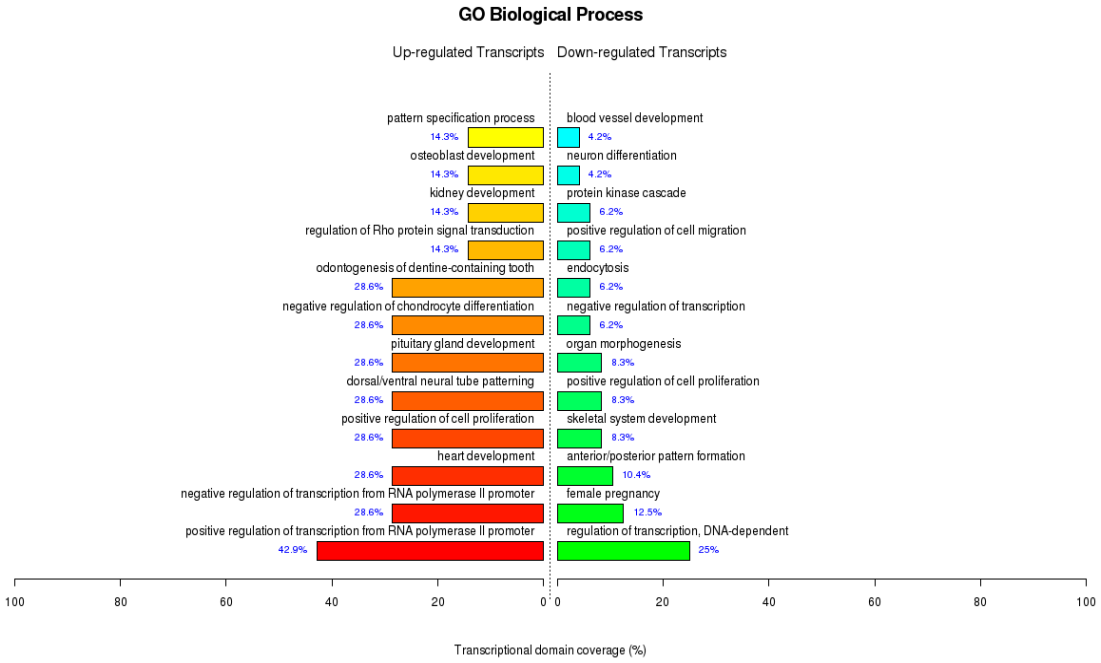


Figura 10 – Categorias relevantes de ontologia gênica para Processo Biológico. Na coluna da esquerda estão representadas as categorias hiperexpressas, enquanto na coluna da direita estão representadas categorias hipoexpressas, onde cada categoria compreende um ou mais genes e a variação de tonalidade da coloração indica a intensidade de expressão desse(s) gene(s)

A figura 11 representa a ontologia de Componente Celular, com apenas seis categorias de transcritos hiperexpressos e doze para os hipoexpressos.

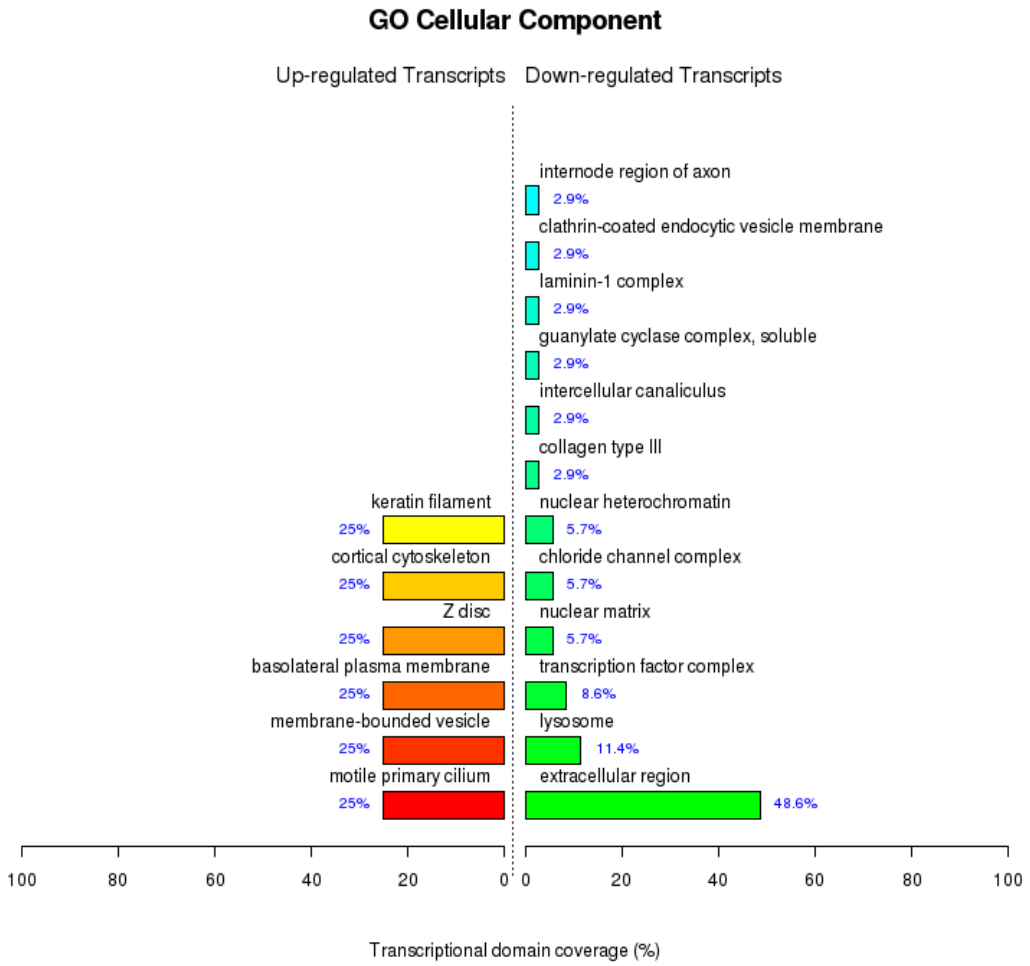


Figura 11 – Representação de categorias relevantes de ontologia gênica para Componente Celular. Na coluna da esquerda estão representadas as categorias hiperexpressas, enquanto na coluna da direita estão representadas categorias hipoexpressas, onde cada categoria compreende um ou mais genes e a variação de tonalidade da coloração indica a intensidade de expressão desse(s) gene(s)

A figura 12 representa a ontologia de Função Molecular, com 11 categorias de transcritos hiperexpressos e 12 de hipoexpressos.

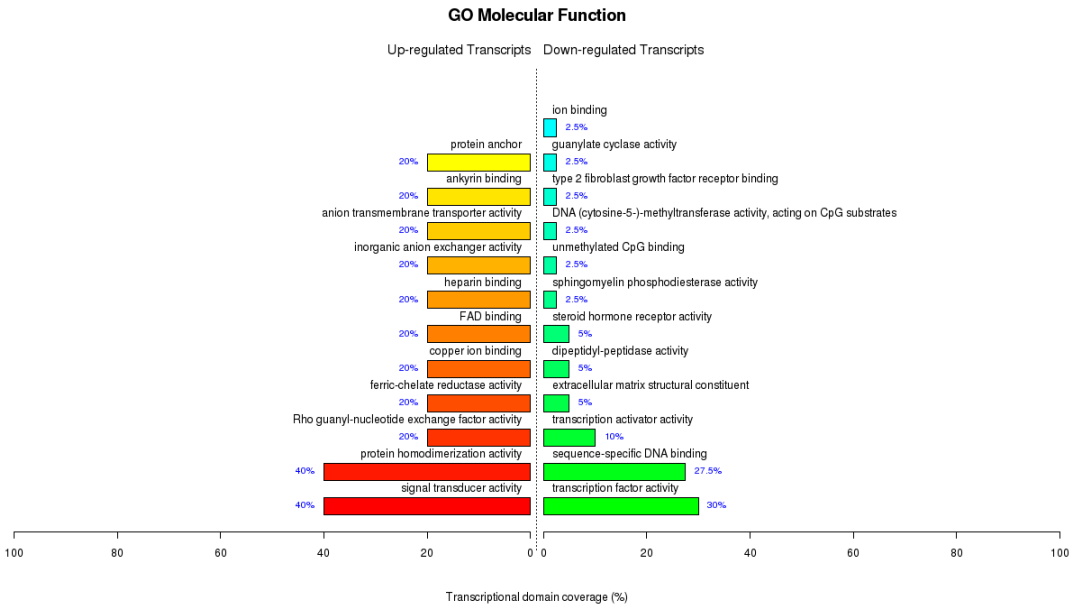


Figura 12 – Representação gráfica de categorias relevantes de ontologia gênica para Função Molecular. Na coluna da esquerda estão representadas as categorias hiperexpressas, enquanto na coluna da direita estão representadas categorias hipoexpressas, onde cada categoria compreende um ou mais genes e a variação de tonalidade da coloração indica a intensidade de expressão desse(s) gene(s)

A partir dos níveis significantes de expressão dos genes, fornecidos pelo programa SAM foi construída a rede de proximidade de temas. Os temas corresponderam a um ou mais genes, conforme Tabela 6.

Tabela 6 - Genes representados em rede de proximidade de temas para Função Molecular

Módulo	Temas	ID	Genes	Nome dos genes
1	insulin binding / insulin-like growth factor receptor activity / insulin-like growth factor I binding	3480	IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
1	poly(U) RNA binding / poly(G) RNA binding	6310	ATXN1	Ataxin 1
1	copper ion binding/ FAD binding	55240	STEAP3	STEAP family member 3
2	stem cell factor receptor activity	3815	KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
2	type 2 fibroblast growth factor receptor binding	2252	FGF7	fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)
2	phospholipase D activity NAPE-specific / phospholipase D activity	5337	PLD1	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific
2	endopeptidase inhibitor activity / purine nucleotide binding / N-acylglucosamine 2-epimerase activity / mannose-6-phosphate isomerase activity	5973	RENBP	Renin binding protein
2	protein-tyrosine sulfotransferase activity	8460	TPST1	tyrosylprotein sulfotransferase 1
2	purine nucleotide binding	2983	GUCY1B3	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3
2	purine nucleotide binding	9367	RAB9A	RAB9A, member RAS oncogene family
2	purine nucleotide binding	26052	DNM3	dynamin 3
2	purine nucleotide binding	28512	NKIRAS1	NFKB inhibitor interacting Ras-like 1
2	phosphatase regulator activity	55589	BMP2K	BMP2 inducible kinase
2	very-low-density lipoprotein receptor activity	3949	LDLR	low density lipoprotein receptor
3	structural constituent of myelin sheath	4155	MBP	myelin basic protein

"continua"

Módulo	Temas	ID	Genes	Nome dos genes
3	aminoacylase activity / aspartoacylase activity	443	ASPA	aspartoacylase (Canavan disease)
3	protein homodimerization activity heparin binding signal transducer activity	652	BMP4	Bone morphogenetic protein 4
3	protein homodimerization activity	6521	SLC4A1	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group)
3	thyroid hormone receptor activity	8013	NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
3	signal transducer activity	4861	NPAS1	neuronal PAS domain protein 1
4	protein anchor anion transmembrane transporter activity	6521	SLC4A1	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1
4	ion binding	55240	STEAP3	STEAP family member 3
4	guanylate cyclase activity Hsp90 protein binding ion binding	2983	GUCY1B3	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3
4	calcium-transporting ATPase activity	489	ATP2A3	ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous
4	ion binding	1193	CLIC2	chloride intracellular channel 2
4	ion binding	196527	ANO6	anoctamin 6
5	outward rectifier potassium channel activity	3776	KCNK2	potassium channel, subfamily K, member 2
5	amine oxidase activity	4128	MAOA	monoamine oxidase A
5	extracellular matrix structural constituent	3910	LAMA4	laminin, alpha 4
5	dipeptidyl-peptidase activity	1803	DPP4	dipeptidyl-peptidase 4
5	extracellular matrix structural constituent	1281	COL3A1	collagen, type III, alpha 1
5	tumor necrosis factor receptor activity	8764	TNFRSF14	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)

"continua" Módulo	Temas	ID	Genes	Nome dos genes
5	retinoid X receptor binding vitamin D3 receptor activity vitamin D response element binding	7421	VDR	vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor
5	dipeptidyl-peptidase activity	2191	FAP	fibroblast activation protein, alpha
5	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase activity, acting on CpG substrates / unmethylated CpG binding	1789	DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta
5	ceramidase activity	427	ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1
6	sequence-specific DNA binding / transcription factor activity	3212	HOXB2	homeobox B2
6	sequence-specific DNA binding / transcription factor activity	5308	PITX2	paired-like homeodomain 2
6	sequence-specific DNA binding / transcription factor activity	3224	HOXC8	homeobox C8
6	sequence-specific DNA binding transcription activator activity steroid hormone receptor activity transcription factor activity	8013	NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
6	sequence-specific DNA binding transcription activator activity transcription factor activity	3225	HOXC9	homeobox C9

"conclusão"

Módulo	Temas	ID	Genes	Nome dos genes
6	sequence-specific DNA binding transcription factor activity	4211	MEIS1	Meis homeobox 1
6	sequence-specific DNA binding transcription factor activity	5087	PBX1	Pre-B-cell leukemia homeobox 1
6	sequence-specific DNA binding transcription factor activity	6474	SHOX2	Short stature homeobox 2
6	sequence-specific DNA binding transcription activator activity transcription factor activity	7421	VDR	vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor
6	sequence-specific DNA binding phosphatidate phosphatase activity sphingosine-1-phosphate phosphatase activity	8611	PPAP2A	phosphatidic acid phosphatase type 2A
6	transcription activator activity	91612	CHURC1	churchill domain containing 1
6	sequence-specific DNA binding	1789	DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta
6	transcription factor activity	8462	KLF11	Kruppel-like factor 11
6	sequence-specific DNA binding / transcription activator activity / transcription factor activity	1051	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
6	sphingomyelin phosphodiesterase activit	10924	SMPDL3A	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A
6	transcription factor activity	4609	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
6	AU-rich element binding	7538	ZFP36	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)

A rede de proximidade de temas dividiu-se em seis módulos, representados por figuras geométricas distintas (Figura 13). O módulo 1 foi representado por triângulo (▲), o módulo 2 por quadrado (■), o módulo 3 por círculo (●), o módulo 4 por losango (♦), o módulo 5 por paralelogramo (▮), e o módulo 6 por hexágono (⬢). As cores, vermelho e verde representam o(s) gene(s) que em sua maioria estavam hiperexpressos ou hipoexpressos, em cada tema, respectivamente.

Cada módulo foi constituído por vários temas podendo ou não apresentar ligações entre si (com a representação indicada por linhas). Quanto mais espessa, contínua e escura a linha, mais forte foram as ligações entre os temas.

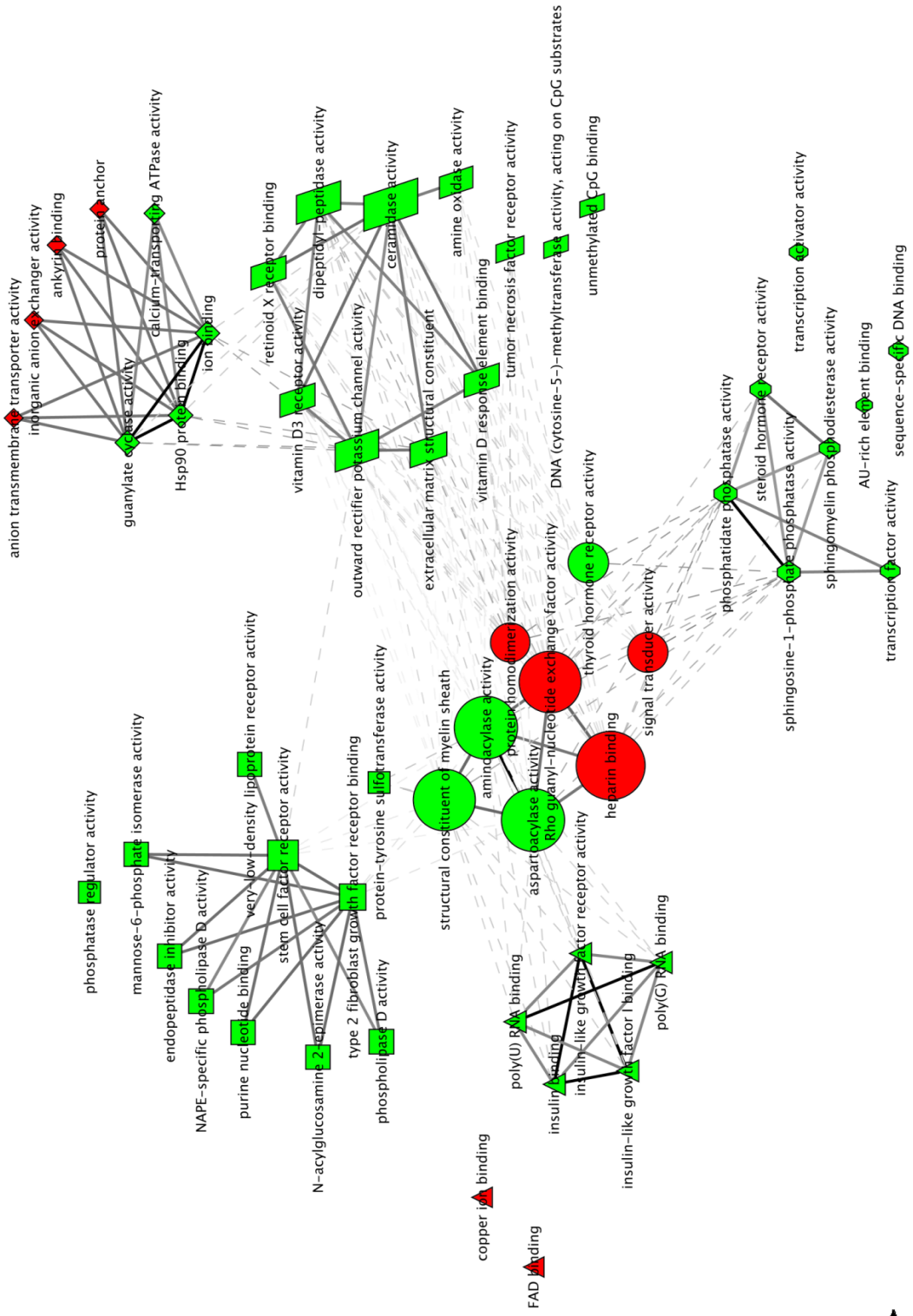


Figura 13 – Rede de proximidade de temas (GO, Função Molecular) Módulo 1 (▲); módulo 2 (■); módulo 3 (●); módulo 4 (♦); módulo 5(▮) e módulo 6 (⬢)

No primeiro módulo de temas (▲) ligado a atividade da insulina e à apoptose destacamos OS temas, fortemente inter-relacionados, *insulin binding, insulin-like growth factor receptor activity e insulin-like growth factor 1 binding*, todos representados unicamente pelo gene hipoexpresso IGF1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*). Apenas um gene foi identificado como hiperexpresso, o STEAP 3 (membro da família STEAP 3), que integra os temas responsáveis por *cooper íon binding* e *FAD binding*.

O módulo 2 (■), apresenta diversos temas, que predominantemente relacionam-se a regulação mitogênica. Dois destes temas aparecem interligados a quase todos os outros, a saber: o *type 2 fibroblast growth factor receptor binding representado pelo* gene FGF7 (*fibroblast growth factor* 7 ou *keratinocyte growth factor*) e o *stem cell factor receptor activity* representado pelo gene KIT (*v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*), ambos genes estão hipoexpressos.

O módulo 3 (●), localizado no centro do mapa, diferencia-se dos demais, por apresentar figuras de maior tamanho, (maior nível de relevância entre os temas na circunstância estudada). Esse módulo caracteriza-se aparentemente pela atividade de diferenciação. Os temas, constituídos por genes hiperexpressos, de maior destaque foram: *heparin binding*, *protein homodimerization activity* e *signal transducer activity*, representado pelo gene BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*) e *Rho guanyl-nucleodtide exchange*

factor activity, representado pelo gene PLEKHG4B [*pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 4B*].

Outros temas do módulo 3, de aparente relevância, caracterizados por genes hipoexpressos foram:

- aminoacylase activity, aspartoacylase activity, representado pelo gene ASPA (aspartoacylase);
- structural constituent of myelin sheath, representado pelo gene MBP (myelin basic protein);

No módulo 4 (♦), os temas estão relacionados predominantemente a função de transporte e ligação de íons. O tema *ion binding*, representado pelos genes STEAP3 (*STEAP family member 3*), hiperexpresso e GUCY1B3 (*guanylate cyclase 1, soluble, beta 3*), hipoexpresso, está ligado aos temas *Hsp90 protein binding* e *guanylate cyclase activity*.

O módulo 5 (▮) está predominantemente associado a matriz extracelular. Um dos temas aparentemente mais importante, por se relacionar a quase todos os demais é o *ceramidase activity*, representado pelo gene hipoexpresso, ASAH1 [*N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)1*].

O tema *Extracellular matrix structural constituent*, também se inter-relaciona aos demais com menos ligações, representado pelos genes COL3A1 (*collagen, type III, alpha1*) e LAMA4 (*laminin, alpha 4*);

O módulo 6 (⬢) é destacado pela predominância de genes que pertencem a classe dos fatores de transcrição:

- *Transcription factor activity*, representado pelos genes MYC [*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian*)], CEBPB [CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta], KLF11 (Kruppel-like factor), VDR [vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor], SHOX2 (short stature homeobox 2), PBX1 (pre-B-cell leukemia homeobox 1), HOXA10 (homeobox A10), MEIS (Meis homeobox 1), HOXC9 (homeobox C9), NR4A3, HOXC8 (homeobox C8), PITX2 (paired-like homeodomain 2), HOXB2 (homeobox B2).

E finalmente, dois temas isolados:

-*Transcription activator activity*, representado pelos genes CEBPB, CHURC1 (*churchill domain containing 1*), VDR, HOXC9 e NR4A3;

-*Sequence-specific DNA binding*, representado pelos genes CEBPB, DNMT3B [*DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta*], PPAP2A, VDR, SHOX2, PBX1, HOXA10, MEIS1, HOXC9, NR4A3, HOXC8, PITX2 e HOXB2.

Também foi gerada pelo aplicativo SAM a rede de interação transcricional baseada na ontologia gênica de função molecular (Figura 13), que retrata as interações mais freqüentes gene-gene. De um total de 946 ligações entre os genes, selecionamos 238 com valor acima do terceiro quartil (0,34).

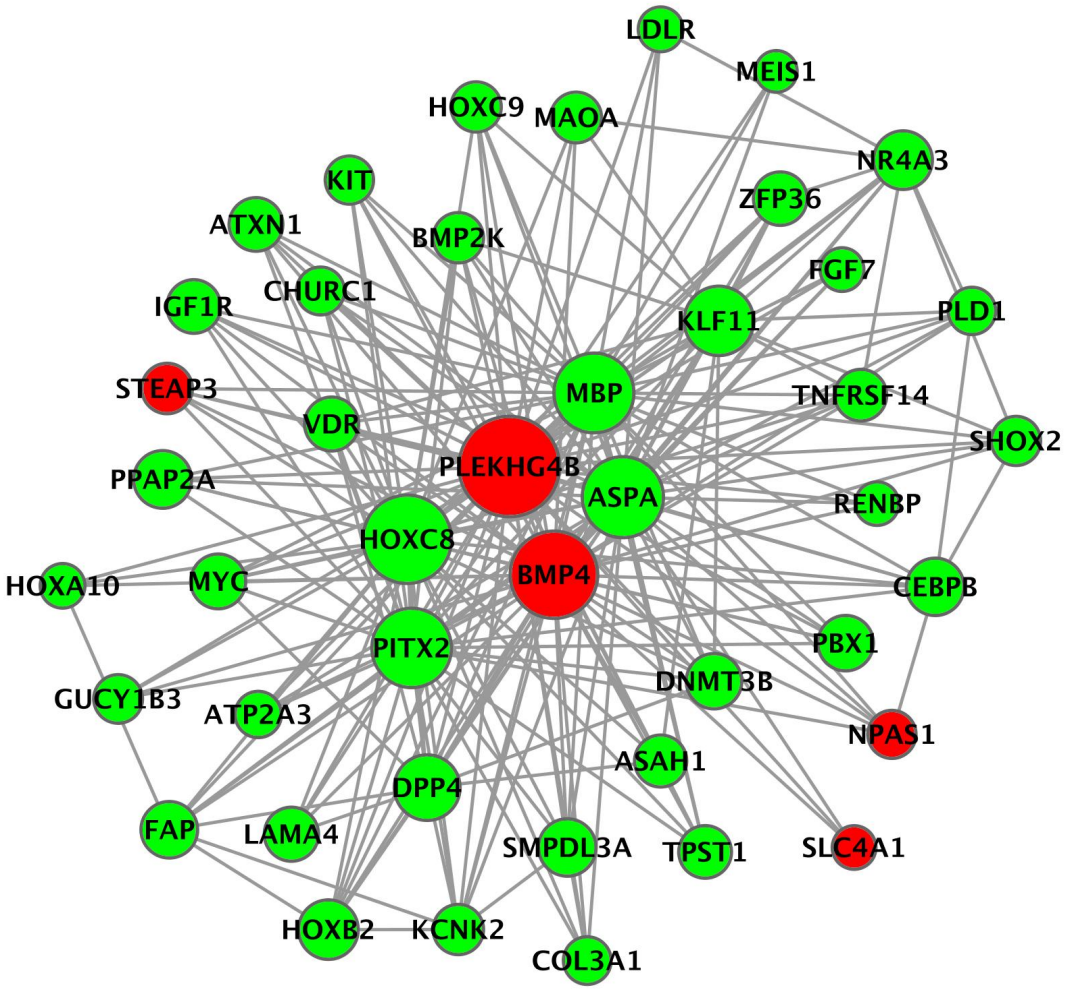


Figura 14 – Rede interação transcricional correspondente ao mapa de proximidade de temas relacionada à ontologia gênica de Função Molecular. Os círculos que aparecem no centro da rede, representam os genes com mais interações. A cor verde representa os genes hipoexpressos, enquanto a cor vermelha representa os genes hiperexpressos

4.5 – Validação de genes diferencialmente expressos

Os oito genes diferencialmente expressos selecionados para validação pelo método qPCR, conforme a sua relevância biológica e/ou pela magnitude de expressão, apresentaram níveis de expressão gênica relativa (Figura 15 e Tabela 7) que confirmam os resultados por *DNA microarray*.

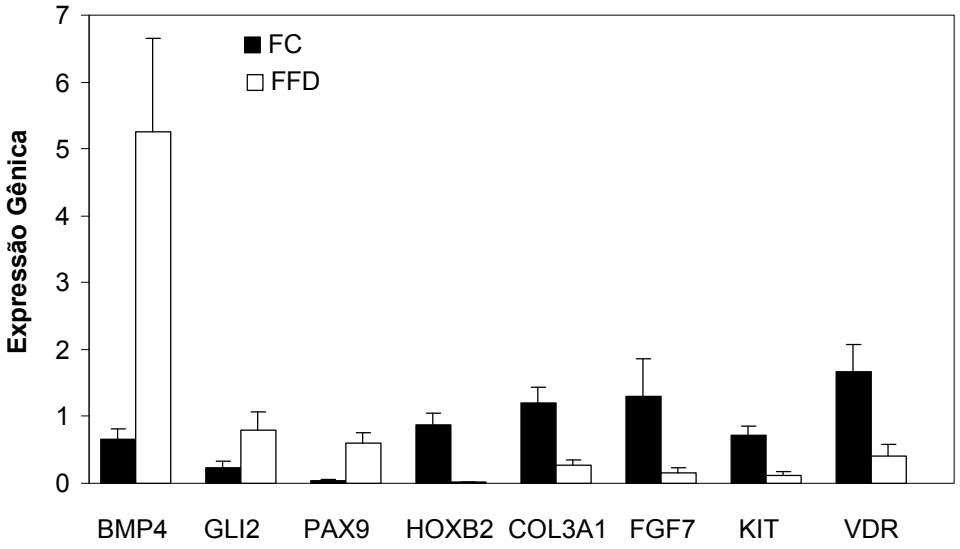


Figura 15 – Níveis de expressão gênica relativa validados pelo qPCR dos genes diferencialmente expressos entre os grupos FC e FFD

Tabela 7 – Genes validados pelo método qPCR com p<0,05, comparados entre os grupos FC e FFD

Genes	*Fold Difference*	t-test (p-valor)
BMP4	8,01 ± 2,23	0,0027
GLI2	3,43 ± 1,12	0,0001
PAX9	13,57± 2,30	0,0370
HOXB2	- 38,06 ± 8,60	0,0010
COL3A1	- 4,49 ± 0,84	0,0191
FGF7	- 7,79 ± 3,39	0,0176
KIT	- 5,90 ± 1,13	0,0335
VDR	- 3,60 ± 0,91	0,0052

Os genes diferencialmente expressos BMP4, GLI2, PAX9, HOXB2, COL3A1, FGF7, KIT e VDR apresentaram *Fold Difference* entre os grupos FC e FFD, estatisticamente significante (p<0,05) (Tabela 7).

5 - DISCUSSÃO

A grande preocupação pelo aumento epidêmico mundial do diabetes melito (DM) deve-se às complicações inerentes à doença, tais como feridas em membros inferiores. Essas feridas representam para a sociedade um dos principais custos de hospitalização, pois seus tratamentos são prolongados e, às vezes, ineficazes culminando em amputações e elevada taxa de mortalidade.[57]

O tratamento dessas úlceras, geralmente, não é resolutivo, necessitando a atenção de diversos profissionais de saúde e diferentes terapias na tentativa de curar estas feridas. Dentre os tratamentos mais citados na literatura estão: o uso de coberturas ou curativos contendo fatores de crescimento, hidrogel, hidrofibra, colágeno liofilizado, oxigênio hiperbárico, terapia de pressão negativa, estimulação elétrica e magnética, laser, ultrassom e enxertos cutâneos autólogos ou “construídos” por bioengenharia. Apesar da diversidade de recursos é difícil verificar a eficácia dessas intervenções, em decorrência da complexa patogênese, que torna o leito da ferida anérgico a esses tratamentos.[58,20]

Diversas pesquisas têm sido realizadas para compreender o papel do fibroblasto na patogênese de feridas, uma vez que esse atua como elemento fundamental no processo de cura.[59] Fatores fenotípicos tais como DM e

modificações no ambiente da ferida podem desencadear alterações na fisiologia dessa célula, explicando, em parte, a ausência ou a demora no processo de cicatrização.[27]

Compreender quais alterações celulares e moleculares influenciam o comportamento dos fibroblastos e conduzem a renitência da ferida é um dos pontos cruciais para se esclarecer a fisiopatologia da úlcera, e posteriormente propor novas terapias.

Para melhor compreender a fisiopatologia dessas feridas, nesta tese foram feitas comparações quanto à proliferação celular e contração experimental da ferida, entre fibroblastos oriundos de indivíduos sadios (FC) e de portadores de úlceras diabéticas em membros inferiores (FFD). Também foi empregada a tecnologia de *DNA microarray* para comparar as diferenças nos perfis de expressão gênica entre esses fibroblastos, a fim de encontrar possíveis justificativas para os fenômenos biológicos investigados.

Para tanto, foram utilizados nos experimentos, fibroblastos obtidos da biópsia de ferida em membro inferior de indivíduos diabéticos do tipo 2, que apresentavam úlceras há seis meses ou mais, caracterizando-se, assim, feridas crônicas que são mais propensas a não cicatrizar e à tornarem-se maiores.[20] Para efeito de comparação, foram utilizados fibroblastos provenientes de excedentes de pele sadia de indivíduos sem DM ou ferida (item 3.4).

Estudos de cicatrização são muito freqüentes em animais, especialmente roedores, porém, estes modelos são restritos em mimetizar condições humanas

de cura das feridas.[60] Modelos porcinos, que se assemelham mais aos humanos ainda são pouco pesquisados.[35,60] Mesmo feridas humanas agudas não reproduzem os efeitos e problemas presentes nas feridas crônicas.[61]

A utilização de cultura de células humanas como ferramenta investigativa de fenômenos *in vivo* tem sido cada vez mais empregada pela comunidade científica.[21] Assim, podemos mimetizar a ferida e melhor compreender os processos que ali ocorrem.

Apesar da dificuldade de obtenção *in vitro* de fibroblastos descrita na literatura,[21] optamos pela utilização da técnica de explante (item 3.5), na qual células presentes nos fragmentos de tecidos migram para a superfície de cultivo de frasco apropriado e começam a se multiplicar. Desta forma selecionamos apenas fibroblastos que ainda apresentam alguma capacidade proliferativa, pois, são estas células as únicas com potencial *in vivo* de cicatrização das feridas. Como nas úlceras crônicas o processo de cura está comprometido, entendemos que deva haver alterações na fisiologia destes fibroblastos que expliquem tal comprometimento.

Uma das primeiras observações relevantes em nosso estudo foi a mudança nítida na característica morfológica da célula (Figura 4). À microscopia de luz, FFDs cultivados nas primeiras amplificações das culturas, já adquiriram aspecto senescente compatíveis com fibroblastos envelhecidos, evidenciando alargamento de suas dimensões, irregularidade de membranas e presença de vacúolos citoplasmáticos (Figura 4A). Características morfológicas semelhantes

foram descritas por Loots et al.[21] que propõem como causa desse fenômeno a interferência de citocinas ou de enzimas proteolíticas presentes nessa ferida, pois na impossibilidade de proliferar este fibroblasto torna-se senescente assumindo um fenótipo hipertrófico. Esses autores ainda postulam que o DM, também, induz alterações normalmente vistas em doenças degenerativas associadas ao envelhecimento.

A capacidade proliferativa dos fibroblastos foi avaliada por ser considerada um dos indicadores de cicatrização no diabetes, uma vez que o progresso da fase proliferativa depende da interação entre diferentes tipos celulares e matriz extracelular, sintetizada pelo fibroblasto.[21,62]

O ensaio de proliferação celular (item 3.5) foi avaliado desde a migração das primeiras células até o 27º dia. O intervalo determinado para quantificação das células foi de três a sete dias. Cada amostra de tecido foi semeada em dois frascos de cultivo distintos, para intercalar o período de contagem em três a quatro dias e assim evitar o risco de perda total das células obtidas em cada amplificação das culturas. O limite de 27 dias foi adotado para evitar o agravamento do efeito de senescência ocasionado por múltiplas passagens. Verificou-se uma tendência quase exponencial na proliferação celular do grupo controle (FC), enquanto no grupo estudo (FFD) a proliferação celular foi muito discreta (Figura 5 e Tabela 2).

De forma contrária aos resultados por nós obtidos, Loots et al.[21] demonstraram importante diminuição na capacidade proliferativa de fibroblastos

de úlcera de diabético. Contudo Morocutti et al.[63] verificaram redução da proliferação celular somente em pacientes portadores de diabetes de longa data e que apresentassem complicações graves. Além disso, Maier e Westendorp[62] fizeram uma extensa revisão de várias publicações que relacionavam proliferação celular com características associadas ao envelhecimento, demonstrando grande heterogeneidade entre os estudos e indicando um viés de análise. Somente em síndromes de envelhecimento prematuro, como síndrome de Down, de Werner, e xerodermia pigmentosa, houve correlação entre envelhecimento celular e menor proliferação.

Houve grande variação na proliferação celular entre as amostras do grupo estudo (FFD), o que interferiu na comparação com o grupo controle (FC), apesar de haver alguma variabilidade individual também nesse grupo (Figura 6). O mesmo achado foi descrito por Wall et al.[64] que mencionam a possível influência do ambiente da ferida, no comportamento heterogêneo, ainda que as características clínicas das áreas doadoras sejam similares.

Além da cultura em monocamada para avaliar a proliferação celular, também foi utilizado modelo experimental de contração de ferida (item 3.6) para verificar a capacidade de fibroblastos reorganizarem a matriz de colágeno, pois o modelo tridimensional é útil para análise de características biomecânicas de interações célula-matriz em situações como as de cicatrização de feridas.[65] A ausência de contração *in vivo* da ferida pode ser um dos fatores que justifica a demora na cura de úlceras de membros inferiores em pacientes diabéticos.[34]

Nosso estudo mostrou mínima contração *in vitro* da matriz de colágeno povoada por fibroblastos. No período de sete dias houve menor contração do gel povoado por FFD (23%), quando comparado àqueles povoados por FC (30%), p <0,001 (Figura 7 e Tabela 3).

O mecanismo de déficit de contração do modelo in vitro é desconhecido, porém há evidências que o estresse oxidativo celular esteja envolvido na diminuição desta contração. Deveci et al.,[37] reverteram o efeito da redução na contração da matriz em meio hiperglicêmico, pela administração de glutationa. No mesmo estudo, os autores sugerem que no estresse oxidativo induzido pelo diabetes, radicais livres de oxigênio acumulam-se, além de ocorrer diminuição de antioxidantes. Assim o desequilíbrio da homeostase da glutationa intracelular permite o aumento dos radicais livres intracelulares, que por sua vez, resultarão em disfunção do fibroblasto, particularmente incapacidade na contração. Apesar de não mensurarmos indicadores de estresse oxidativo, acreditamos que a presença desses, possa explicar, ao menos em parte, a redução ou a incapacidade na contração da matriz de colágeno pelos fibroblastos provenientes da úlcera de diabéticos.

As modificações no comportamento dos fibroblastos avaliados pela proliferação celular e contração da matriz de colágeno, foram complementadas pela identificação do perfil de expressão gênica dos fibroblastos de úlcera comparada aos de pele sadia pela técnica de *DNA microarray*.

A técnica de *DNA microarray* (item 3.8) é uma ferramenta de análise de expressão gênica que permite identificar milhares de genes em uma amostra de material biológico. Em nosso estudo, foram extraídas amostras de RNA dos fibroblastos cultivados (FC e FFD) (item 3.8.1). A primeira etapa foi a avaliação da quantidade e qualidade deste RNA utilizando-se um bioanalizador (Bioanalyzer 2100) (item 3.8.2), pois estas características podem comprometer a qualidade das análises subseqüentes. Existe na literatura um índice de quantidade / qualidades do RNA denominado *RNA Integrity Number* (*RIN*). Nossas amostras foram consideradas ótimas em concentração e pureza de RNA (RIN > 8.2) (Figura 8 e Tabela 4), desta forma pudemos submetê-las, com segurança, aos procedimentos de hibridização (item 3.8.3).

A imagem, resultante da hibridização, obtida pelo escâner foi interpretada por um programa de bioinformática denominado *R* (item 3.8.3) e os resultados convertidos em valores matemáticos. É importante garantir a qualidade destes resultados matemáticos, pois a leitura e interpretação incorretas podem comprometer a confiabilidade dos resultados.

Após a verificação da qualidade dos dados, os resultados matemáticos foram submetidos à análise em um pacote de aplicativos de bioinformática específicos chamado MeV (*Multiexperiment Viewer*) (item 3.8.4). Os dados foram, então, analisados pelo aplicativo de estatística SAM (Significance Analysis Microarray – t-test) (incluído no MeV) que determina os genes diferencialmente expressos segundo sua intensidade (Figura 9). Em nosso

estudo a analise SAM identificou 143 genes diferencialmente expressos (Tabela 5).

A seguir as informações sobre as categorias enriquecidas de ontologia gênica (*gene ontology enrichment – GO*) entre os genes diferencialmente expressos foram obtidas, no mesmo pacote de aplicativos MeV, com base nas informações do *GO* e *KEGG* (Tabela 5).

Dos 143 genes identificados, 21 foram descartados, por ainda serem desconhecidos e, portanto, sem qualquer informação disponível, oito genes apresentaram duas isoformas sendo, também, descartados. Dos 114 genes restantes, 10 estavam hiperexpressos e 104 hipoexpressos (Tabela 6).

A análise minuciosa da lista de genes diferencialmente expressos no *DNA microarray* proporciona uma grande quantidade de informações relevantes. Além do perfil de expressão, muito útil para o agrupamento de amostras, a análise dos dados também pode ser interpretada com base em redes transcricionais que permitem observar a interação gene-gene a partir de dados de expressão, exibidas como um diagrama de rede de interação entre elementos.[66] Esse modelo analítico é organizado com base na abstração do processo celular, representado formalmente por um tema biológico, que apresenta a função de transcritos, conforme descrito em banco de dados genômico (exemplo: GO e KEGG). Nesse sistema é quantificada a proximidade contextual dos temas, baseados na similaridade da descrição de seus perfis

transcricionais. De modo que, temas relevantes sejam então, relacionados em uma rede de proximidade de temas.[56]

Seria possível encerrar as análises do *microarray* somente com as correlações gênicas do fenômeno estudado, utilizando conhecimentos já publicados (ou anotados) em banco de dados sobre aquele(s) gene(s), porém, optamos por estudar os níveis de expressão dos principais genes com suas respectivas participações e influências no estudo de úlceras em pacientes diabéticos.

No aplicativo denominado *FunNet* são gerados gráficos de representação do perfil funcional (item 3.8.4) que expressam as principais categorias biológicas, constituídas por genes hiper e hipoexpressos, para cada ontologia, a saber: Processo Biológico (Figura 10), Componente Celular (Figura 11) e Função Molecular (Figura 12). Utilizando-se, ainda, o *FunNet* é possível obter, para cada ontologia, a rede de interação de temas denominada “rede” ou “mapa”, mas para que a análise dos resultados obtidos não seja puramente matemática é necessário correlacionar os dados contidos nos mapa com a relevância biológica do(s) fenômeno(s) estudado(s). Entende-se por tema a reunião de um ou mais genes. Neste estudo, selecionamos a ontologia gênica Função Molecular pela melhor correlação entre os dados matemáticos obtidos e os fenômenos biológicos presentes nas úlceras de membros inferiores de indivíduos portadores de diabetes melito.

O mapa é constituído por módulos, que são agrupados conforme suas afinidades funcionais. De maneira didática, cada módulo é representado por uma figura geométrica distinta e as ligações entre os temas, representadas por traços contínuos ou pontilhados de maior ou menor intensidade a depender da força de interação entre eles.

Em nosso estudo foram considerados os temas e genes que apresentaram descrições biológicas correlacionáveis aos fenômenos de modificação no comportamento de fibroblastos de ferida em indivíduos com DM. Nosso mapa de interação de temas para ontologia Função Molecular (Figura 13) é composto por seis módulos.

No módulo 1 (▲) estão relacionados os temas, representados por genes hipoexpressos, ligados a atividade receptora da insulina e à apoptose, que apresentam grande influência no processo de cicatrização em indivíduos portadores de diabetes.[67,68]

Os temas relevantes no módulo 2 (■), representados por genes hipoexpressos, participam da regulação mitogênica e renovação celular. Foram descritas na literatura a diminuição tanto da atividade mitogênica quanto da renovação celular em cultura de fibroblastos humanos,[36] e em tecido de feridas em modelo animal.[69]

No módulo 3 (●), foram destacados temas representados por genes hipoexpressos e hiperexpressos que aparentemente podem ser caracterizados pelas atividades de migração e diferenciação celular, relacionadas a fatores de

crescimento, responsáveis pela proliferação, migração, diferenciação e apoptose que segundo a literatura estão em desequilíbrio em feridas crônicas.[70,36]

O módulo 4 (♦) relaciona temas, representados por genes hipoexpressos e hiperexpressos envolvidos na ligação de íons. Entre os íons regulados nesses temas, ressaltamos a presença do ferro livre em quantidades aumentadas, associados às espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species – ROS) que protagonizam condições pró-oxidantes hostis à cicatrização.[71]

No módulo 5 (▮) estão temas, representados por genes hipoexpressos associados à matriz extracelular. De acordo com Hodde e Johnson,[72] a incapacidade da matriz extracelular em estimular a cicatrização é uma das principais causas do leito anérgico em feridas crônicas.

O módulo 6 (⬢) é destacado pela predominância de genes que pertencem a classe dos fatores de transcrição, que regulam muitas funções primordiais na manutenção e restauração da pele, desde a proliferação e diferenciação até a migração celular.[73]

Além do mapa de interação de temas, foi gerada a rede de interação transcricional da ontologia Função Molecular (Figura 14) que possibilita verificar a ligação entre os genes e sua regulação. À semelhança do mapa de temas, a relevância do gene está associada ao tamanho das figuras geométricas e à

centralidade na rede. Todos os genes aparecem posicionados e interligados conforme sua relação funcional.

Na rede de interação transcricional desse estudo alguns genes relevantes apresentam papel biológico desconhecido e, embora matematicamente relevante, suas representações necessitarão ainda ser esclarecidas em estudos posteriores.

Na parte central da rede de interação gênica destacam-se dois genes hiperexpressos o PLEKHG4B e o BMP4 (ambos do módulo 3). Sendo o PLEKHG4B [pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 4B], o mais importante, por estar localizado no centro da rede. Aparenta ter grande capacidade de interferência na regulação dos demais genes hiper e hipoexpressos. Apesar de ser a figura central nessa rede, sua atividade ainda não foi descrita. A única função atribuída ao tema, e não ao gene, propriamente dito, é a estimulação da troca de nucleotídeos guanil associada a uma GTPase da família Rho.

Sob condições fisiológicas, a concentração de GTP é maior do que a do GDP, favorecendo a substituição de GDP por GTP em associação com a GTPase na célula.[74]

Acreditamos que pelo fato do gene PLEKHG4B possuir um domínio RhoGef, (Rho Guanine exchanger factor), tenha atividade similar às proteínas Rho de mesmo domínio, tais como: CDC42, Rac1 e Rho. Proteínas que regulam as vias de sinalização mediadoras das mudanças no citoesqueleto de

actina requeridas tanto na adesão célula-célula quanto na migração celular.[75] Em fibroblastos, as proteínas Rho regulam a formação de complexos focais e a polimerização de microtúbulos contendo actina.[75] Quando os microtúbulos se despolimerizam, na ausência de proteínas Rho, a célula perde a polaridade e aumenta a força contrátil, pela ação das cadeias de actina-miosina.[76] A comprovação desse fato, foi constatada por experimento que inibiu a polimerização de microtúbulos com o fármaco nocodazol, em populações de fibroblastos imersos em matriz de colágeno; resultando em aumento na força de contração isométrica dessas células na matriz de colágeno.[76]

Assim, se houver correlação entre o gene PLEKHG4B e a regulação da função do citoesqueleto de actina, particularmente na polimerização de microtúbulos, a hiperexpressão desse gene, pode ser um dos fatores responsáveis pela redução na capacidade de contração da matriz extracelular de colágeno povoada pelo fibroblasto da ferida de diabético, como constatado em nossos resultados.

Mais um gene presente no centro da rede é o BMP4. Esse gene codifica uma proteína morfogênica de osso que faz parte da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF-β). O BMP4 está relacionado a uma grande variedade de funções, como desenvolvimento de órgãos e tecidos, morfogênese, diferenciação, sinalização, proliferação,[77] senescência e apoptose celular.[78,79,80] Devido à sua participação em vários processos biológicos, torna-se difícil identificar a influência predominante desse gene, no

comportamento do fibroblasto da úlcera em diabéticos. Nossos resultados demonstraram anormalidades morfológicas compatíveis com senescência celular. Darby et al.[81] constataram índices aumentados de apoptose em fibroblastos de ferida em ratos diabéticos, resultando em retardo na cicatrização. Possivelmente a hiperexpressão do BMP4 contribui para o aumento de apoptose nos fibroblastos de úlcera em diabéticos.

Os genes ASPA e MBP (ambos do módulo 3) estão hipoexpressos. O gene ASPA codifica uma enzima que catalisa a conversão de ácido N-acetil L-aspártico em aspartato e acetato. Esse ácido é abundante no cérebro e tem papel de *scavenger* em outros tecidos, porém não há maiores detalhes, na literatura, a este respeito. O gene MBP codifica a principal proteína constituinte da bainha de mielina. Apesar da importância de ambos os genes na rede, também não foi possível associá-los aos eventos ocorridos com os fibroblastos estudados.

Outros genes, também em destaque, são o HOXC8 e o PITX2 (ambos do módulo 6) pertencentes à família homeobox (HOX).

Os genes homeobox codificam a família dos fatores de transcrição, que possuem importante papel como reguladores do crescimento e diferenciação em todos os organismos multicelulares. Esses genes atuam no topo de uma hierarquia genética de via de controle, pois muitos processos celulares são regulados pela rede HOX. Esses genes podem interagir com diferentes classes gênicas, em diferentes estágios do desenvolvimento e em tipos específicos de

tecidos.[82] Recebem esse nome por possuírem um segmento de DNA (o homeobox), que codifica uma proteína (homeoproteína) cuja função é de fator de transcrição, responsável por interagir com genes alvos, modulando-os. Ainda se conhece pouco sobre os genes alvos, mas sugere-se que as homeoproteínas atuam em genes que codificam moléculas de adesão, fatores de crescimento e proteínas de matriz extracelular.[83]

Ao menos 34 genes são alvos do HOXC8 e participam, em algum momento, dos processos de proliferação, adesão, migração, metabolismo celular, além de serem reguladores globais do crescimento e diferenciação. [84] Considerando-se que esses genes são mediadores do desenvolvimento celular fisiológico, podem estar envolvidos em condições anormais, quando regulados de forma aberrante.[84] Em virtude da grande influência sobre diversas vias, o HOXC8 tem papel importante em cânceres de próstata, pulmão, leucemias e outras condições pré-cancerosas.[85] Apesar da participação em vários processos biológicos não há publicações que correlacionem esse gene à cicatrização de feridas. Porém, podemos inferir que sua hipoexpressão possa influenciar genes que estejam relacionados à resolução da ferida.

O PITX2 codifica uma proteína que atua como fator de transcrição e regula a expressão do gene procolágeno lisil hidroxilase (PLOD), que hidroxila lisina em colágeno. O resíduo de hidroxilisina é essencial para fornecer estabilidade às ligações intermoleculares, ou seja, oferece resistência à molécula de colágeno contra a degradação enzimática.[86] Sua ausência gera

comprometimento na produção de colágeno e fragilidade desse. Crê-se que a hipoexpressão do PITX2, possa interferir na regulação do gene PLOD e assim, prejudicar a síntese de colágeno na úlcera do diabético.

Os demais genes dessa família que aparecem em posição periférica na rede, porém, por apresentarem predominância funcional similar, estão aqui citados: HOXB2, HOXC9, HOXA10, SHOX2, MEIS, PBX1, CEBPB, KLF11 (todos do módulo 6).

O gene FGF7 (módulo 2), que nesse estudo está hipoexpresso pertence à família dos fatores de crescimento de fibroblastos, com ampla atividade mitogênica e de sobrevivência celular. Esse gene está envolvido em uma grande variedade de processos biológicos, incluindo desenvolvimento embrionário, crescimento celular, morfogênese, reparo tecidual, crescimento e invasão tumoral.[87] Experimentos em modelo animal verificaram aumento na expressão de FGF7 em feridas ou na cicatrização fisiológica, por outro lado, em animais mais velhos e naqueles diabéticos a expressão desse gene está reduzida. Isso sugere que um defeito na regulação do FGF7 possa causar desarranjo na cicatrização.[88]

O gene KIT (módulo 2), também hipoexpresso codifica a proteína homóloga humana do proto-oncogene c-kit. Essa proteína é um receptor transmembrana tipo 3 para fator de crescimento de mastócitos, também conhecida como fator de células-tronco. A ativação do receptor c-kit tem sido relacionada à quimiotaxia, renovação, proliferação, adesão e sobrevivência celular. Outras funções incluem a formação de cicatriz e cicatrização. A

presença do c-kit aumenta a contração tridimensional em matriz de colágeno povoada por fibroblastos.[89] A hipoexpressão do gene KIT pode ter alguma influência na menor contração da matriz de colágeno povoada por fibroblastos de úlcera de membros inferiores de diabético, observada em nossos resultados.

Como afirmamos anteriormente, alguns genes, embora tenham localização periférica no mapa, devem ser ressaltados por sua relação com os fenômenos biológicos apresentados neste estudo. Entre eles, está o gene relacionado à atividade da insulina, IGF1R (módulo 1) que é membro da família das tirosinas quinases, receptor de alta afinidade que se liga ao fator de crescimento similar à insulina. O IGF1R possui papel crítico em eventos de transformação celular. Este gene encontra-se altamente expresso na maioria dos tumores malignos teciduais, onde atua como agente anti-apoptótico aumentando a sobrevida celular.

Experimentos utilizando exsudatos de feridas de ratos diabéticos verificaram baixos níveis de IGF-1R, entre outros homólogos da insulina, sugerindo que no diabetes, a deficiência de insulina possa contribuir para a não cicatrização.[67] Em concentrações fisiológicas a insulina promove proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno. Por outro lado, sua carência pode ser um dos responsáveis pelo retardo na cicatrização em indivíduos diabéticos.

A hiperexpressão de IGF-1R torna o fibroblasto resistente aos sinais apoptóticos, excedendo a produção de matriz extracelular, e resultando em hipertrofia cicatricial.[90] De modo contrário, podemos inferir que a hipoexpressão

do IGF-1R, como verificado em nosso estudo, tornaria o fibroblasto suscetível a apoptose e propenso a hipotrofia.

O gene STEAP3 (módulos 1 e 4) é uma metaloredutase e está relacionado à via de sinalização da p53, cuja ativação é induzida por uma série de sinais de estresse, incluindo danos no DNA, estresse oxidativo e oncogenes ativados. A proteína p53 é empregada como ativador de transcrição dos genes p53-regulados. Isso resulta em três possíveis conseqüências: parada do ciclo celular, senescência celular ou apoptose. O aumento da p53 em feridas de animais diabéticos está correlacionado à diminuição de resposta celular proliferativa, e conseqüentemente prejuízo na capacidade cicatricial.[91,92] Talvez a participação de exossomas (vesículas citoplasmáticas com função transportadora que partem de seu local de origem indo até a membrana celular) seja responsável pela modificação na atividade de células adjacentes às já deficientes, porém não há na literatura dados que corroborem esta hipótese. Provavelmente a aparência de senescência celular dos fibroblastos das úlceras de diabéticos (Figura 3A), observada nesse trabalho, possa estar relacionada à hiperexpressão do STEAP3.

O gene GUGY1B3 (módulo 4) codifica a enzima guanilato ciclase solúvel que pode formar um complexo protéico com a proteína HSP90 (*heat shock protein 90*), catalisando a conversão de GTP a um segundo mensageiro, o GMP cíclico, e funcionando como principal receptor para o óxido nítrico.[93] A ativação da guanilato ciclase conduz a formação de GMP cíclico, proposto como mecanismo de efeito anti-apoptótico, particularmente em células endoteliais. O

HSP tem ação citoprotetora associada a altos níveis de expressão dessa proteína, conferindo resistência a apoptose.[94] Como não há estudos que relacionem a enzima codificada por esse gene com fenômenos de cicatrização, seria necessário maiores investigações para comprovar se a hipoexpressão do gene GUCY1B3 resultaria em apoptose.

O gene ASAH1 (módulo 5) codifica a enzima ceramidase, que catalisa síntese e degradação de ceramida em esfingosina e ácido graxo. O esfingolipídeo ceramida é um segundo mensageiro que interrompe a replicação normal da célula, resultando em anti-proliferação, apoptose e interrupção do ciclo celular.[95] Níveis aumentados de ceramida são encontrados em fibroblastos senescentes e em alguns tecidos, onde atua como indutor da apoptose.[96] A desregulação dos níveis de ceramida que resulta em seu acúmulo ainda não foi esclarecida, mas um dos mecanismos sugeridos é o defeito na atividade enzimática.[95] Como uma das enzimas que regulam a degradação desse esfingolipídeo é a ceramidase, codificada pelo gene ASAH1, podemos deduzir que sua hipoexpressão tenha como conseqüência o aumento de ceramida, embora não exista dados comprobatórios. Nesse trabalho, a característica senescente dos fibroblastos da ferida, talvez possa ter alguma correlação com essa hipótese.

O gene COL3A1 (módulo 5), codifica a proteína pró-alfa 1 do colágeno tipo III, um colágeno fibrilar encontrado em tecidos conectivos extensíveis tais como pele, pulmão, útero, intestino e sistema vascular, freqüentemente

associado ao colágeno tipo I. Sato et al.[97] estudando cultura celular de fibroblastos oriundos de quelóide, pele normal, cicatriz hipertrófica e atrófica verificaram não haver diferença significante na expressão de RNA de proteína pró-alfa 1 do colágeno tipo III. Apenas nas culturas tridimensionais foi observada maior expressão de colágeno em cicatriz hipertrófica e quelóide, quando comparada aos demais grupos. Isso sugere que a maior deposição de colágeno em cicatrizes excessivas pode ser em parte, resultado de maior expressão gênica. É possível que a hipoexpressão do gene COL3A1 em fibroblastos de úlcera de diabético possa conduzir à menor síntese e deposição de colágeno tipo III, que contribuiria para a persistência da ferida, estudos subseqüentes serão necessários para confirmação dessa hipótese.

O gene LAMA4 (módulo 5) codifica a laminina 4 da família das glicoproteínas de matriz extracelular que são os principais constituintes não colagenosos da membrana basal. As glicoproteínas Participam de ampla variedade de processos biológicos, tais como adesão, diferenciação, migração e sinalização celular. Sugere-se que a laminina 4 media a anexação, migração e organização de células nos tecidos durante o desenvolvimento embrionário, pela interação com outros componentes da matriz extracelular. As lamininas são compostas por três cadeias (alfa, beta e gama), cujas funções biológicas ainda são desconhecidas. O gene LAMA4 codifica a isoforma da cadeia alfa 4, cuja estrutura é similar à alfa 3, e está presente em laminina-8.[98] Devido a seu potencial estimulador de migração celular e sua localização preferencial na

membrana basal da pele, acredita-se que a laminina possa ter papel no processo de migração celular durante a cicatrização de feridas.[99] Todavia não podemos inferir que, em nosso estudo, a hipoexpressão do gene LAMA4 seja responsável pela migração deficitária de fibroblastos em feridas de diabéticos, pois seriam necessárias maiores investigações a esse respeito.

Os resultados do experimento qPCR para validação da técnica de *DNA microarray* confirmaram as diferenças na expressão gênica para os genes selecionados (Figura 7 e Tabela 15).

Por fim, sabemos que vários fenômenos interferem no processo de cicatrização das feridas crônicas, em particular das úlceras de membros inferiores em indivíduos diabéticos. A não contração dessas feridas é um deles. Até há pouco tempo acreditava-se que este fato decorria, simplesmente, do pequeno número de células ali presentes e da incapacidade dessas células reorganizarem a matriz extracelular.

Nesse estudo pudemos verificar que fibroblastos presentes no tecido de granulação das feridas possuíam capacidade exígua em reorganizar o modelo experimental de contração de matriz extracelular e que este evento estava relacionado a mudanças no fenótipo das poucas células com capacidade proliferativa, ali existentes. As modificações de expressão gênica nestes fibroblastos sugerem forte indução à senescência e apoptose celular, bem como déficit na síntese e contração de fibras colágenas.

O presente estudo da expressão gênica diferencial de fibroblastos oriundos de úlcera de indivíduos diabéticos representa o primeiro passo, para

investigações em estudos futuros, que permitirão esclarecer a relação destes genes com a não resolução de tais úlceras.

6. CONCLUSÕES

A comparação *in vitro* das modificações em fibroblastos derivados de ferida de membro inferior de indivíduos diabéticos com os de pele normal, permitiu as seguintes conclusões:

Não houve diferença estatisticamente significante quanto à proliferação celular de fibroblastos derivados de ferida quando comparados aos de pele normal. Porém houve uma tendência a maior proliferação celular após o vigésimo primeiro dia para os fibroblastos derivados de pele normal.

Quanto à capacidade de contração de modelo tridimensional de matriz de colágeno povoado por células evidenciou-se menor contração dos géis povoados por fibroblastos oriundos de úlceras de indivíduos diabéticos quando comparada às matrizes povoadas por fibroblastos normais e esta diferença foi estatisticamente significante.

A investigação do perfil de expressão gênica possibilitou identificar 143 genes diferencialmente expressos, majoritariamente hipoexpressos, em fibroblastos derivados de úlcera de membro inferior de indivíduo diabético quando comparados a fibroblastos de pele normal. Dentre os quais destacamos aqueles relacionados a processos de senescência e apoptose celular, bem como déficit na síntese e contração de fibras colágenas.

7 – ANEXOS

Anexo A – Aprovação do estudo pela Comissão de Ética

HC

Carta datada de 12.01.10

Ao
Departamento de Cirurgia
Dra. Mônica Beatriz Mathor

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 10.02.10, **APROVOU** as alterações no Protocolo de Pesquisa nº **0360/08** intitulado **"Estudo In vitro da utilização de ácido retinóico em fibroblastos de úlceras de membros inferiores de indivíduos portadores de Diabetes Mellitus."**, bem como tomou **ciência** do relatório parcial do projeto.

- ✓ **Emenda ao Protocolo de Pesquisa**
- ✓ **Mudança de Titulo para: "Comparação Das Modificações Gênicas De Fibroblastos Derivados De Ulcera De Membro Inferior Em Indivíduos Diabéticos e De Pele Normal"**

CAPPesq, 10 de Fevereiro de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

ciente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5° andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

DR. MARCUS VINICIUS GEMMAL
Professor Titular de Cirurgia Plástica

RECEBIDO SPG 01/03/10
ASS.

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa estudar o comportamento alterado das células da ferida do pé diabético.

Será necessário coletar uma amostra de pele da borda da ferida (biópsia), durante algum dos curativos. A amostra terá 4 milímetros (tamanho da cabeça de um fósforo) de onde serão obtidas as células para estudo no laboratório. No laboratório será avaliada, a capacidade de multiplicação dessas células e as alterações na genética quando comparados a células normais.

O procedimento não leva mais que alguns minutos, neste período você poderá sentir uma dor momentânea e poderá ocorrer um pequeno sangramento, que será acompanhado pelo médico até que melhore completamente.

O conhecimento do comportamento alterado das células de feridas de pé diabético, poderá resultar em estudos que irão direcionar o tratamento dessas feridas.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Mônica Beatriz Mathor e a pesquisadora é a Elisabeth Mie Hosaka que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Arnaldo, 455, 2º andar, sala 1260, Jd América, CEP 01246-903, Telefone(s) 3062-0415. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Será garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. O material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Comparação de modificações no comportamento celular e gênico de fibroblastos derivados de úlcera de membro inferior em indivíduos diabéticos e de pele normal"

Eu discuti com a Elisabeth Mie Hosaka sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____ Data ___/___/___

Assinatura do paciente/representante legal

_____ Data ___/___/___

Assinatura da testemunha

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

8. REFERÊNCIAS

1 World Health Organization. *Definition and diagnosis diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation Geneva: WHO*. 2006. [cited 2009 Jan 30]. Available from: http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes_new.pdf.

2 Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt AJ, Azevedo MJ de. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002; 46(1):16-26.

3 Wild S, Roglic G, Green A, Sigree R, King H. Global prevalence of diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27(5): 1047-53.

4 Mbanya JC. New diabetes figures in China: IDF press statement. International Diabetes Federation. 2010 March [cited 2010 July 28]. Available from: http://www.idf.org/press-releases/idf-press-statement-china-study.

5 Malerbi D, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban brazilian population aged 30-69 years. *Diabetes Care*. 1992; 15(1): 1509-16.

6 World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus, 1999.

7 Gomes MB, Cobas R. Diabetes mellitus. In: Grossi SAA, Pascali PM. Cuidados de Enfermagem em Diabetes Mellitus. São Paulo: Departamento de Enfermagem da Sociedade Brasileira de Diabetes; 2009. p.6-17.

8 Gross JL, Ferreira SRG, Franco LJ, Schimidt MI, Motta DG, Quintão E, Netto AP. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2000;44 (supl 1):5-32.

9 Manley SM, Meyer LC, Neil HAW, Ross IS, Turner RC, Holman RR. Complications in newly diagnosed type 2 diabetic patients and their association with different clinical and biochemical risk factors. UKPDS 6. *Diabetes Res*. 1990;13:1-11.

10 Lobmann R, Schultz G, Lehnert H. Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications. *Diabetes Care*. 2005; 28(2):461-8.

11 Rathur HM, Boulton AJM. The neuropathic diabetic foot. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3(1):14-25.

12 Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA*. 2005;293(2):217-28.

13 Reiber GE, Vileikyte L, Boyko EJ, del Aguila M, Smith DG, Lavery LA, Boulton AJ. et al. Causal pathways for incident lower-extremity ulcers in patients with diabetes from two settings. *Diabetes Care*. 1999;22(1):157-62.

14 Reiber GE, Boyko EJ, Smith DG. Lower extremity foot ulcers and amputations in diabetes. In Harris MJ, Stern MP, editors. Diabetes in America. Bethesda, Maryland: US Government Printing Office; 1995 409-28.

15 International Diabetes Federation. Time to Act: Diabetes and foot care. Brussels. International Diabetes Federation, 2005.

16 Moulik PK, Mtonga R, Gill GV. Amputation and mortality in new-onset diabetic foot ulcers stratified by etiology. *Diabetes Care.* 2003;26(2):491-4.

17 Reiber GE. *Epidemiology of foot ulcerations and amputations in diabetes*. 6th ed St Louis MO, Mosby 2001.

18 Apelqvist J, Larsson J, Agardh CD. The influence of external precipitating factors and peripheral neuropathy on the development and outcome of diabetic foot ulcers. *J Diabetes complications.* 1999;4:1-25.

19 Peters EJ, Armstrong DG, Lavery LA. Risk factors for recurrent diabetic foot ulcers. *Diabetes Care.* 2007;30(8):2077-9.

20 Sibbald RG, Woo KY. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008;24(Suppl 1):S25-S30.

21 Loots MAM, Lamme EN, Mekkes JR. 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.

22 Ferguson MW, Herrick SE, Spencer MJ, Shaw JE, Boulton AJ, Sloan P. The histology of diabetic foot ulcers. *Diabet Med*. 1996;13:S30-3.

23 Brem H, Stojadinovic O, Diegelmann RF. Molecular markers in patients with chronic wounds to guide surgical debridement. *Mol Med*. 2007;13(1-2):30-9.

24 Margolis DJ, Kantor J, Berlin JA. Healing of diabetic neuropathic foot ulcers receiving standard treatment. A meta-analysis. *Diabetes Care*. 1999;22:692-5.

25 Isaac C, Mathor MB, Bariani G, Paggiaro AO, Herson MR, Goldenstein-Schainberg C, Carrasco S, Teodoro WR, Yoshinari NH, Ferreira MC. Pentoxifylline modifies three-dimensional collagen lattice model contraction and expression of collagen types I and III by human fibroblasts derived from post-burn hypertrophic scars and from normal skin. *Burns*. 2009;35(5):701-6.

26 Isaac C. *Estudo in vitro da ação de pentoxifilina em fibroblastos oriundos de cicatrizes hipertróficas pós-queimadura e de pele não-cicatricial*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

27 Middelkoop E. Fibroblast phenotypes and their relevance for wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*. 2005;4(1):9-11.

28 Gabbiani G, Rayan GB, Majno G. Presence of modified fibroblast in granutlation tissue and possible role in wound contraction. *Experientia* 1970;27(5):549-50.

29 Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Ciênc Farmac*. 2005;41(1):27-50.

30 Clark RAF. Cutaneous tissue repair:basic biologic considerations. Journal of the *American Academy of Dermatology*. 1985;13:701-25.

31 Gomez DS, Mariani U, Pinto WS, Gemperli R, Ferreira MC. Contraction and myofibroblasts in restored skin. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1998;32:147–55.

32 Sweitzer SM, Fann SA, Borg TK, Baynes JW, Yost MJ. What is the future of diabetic wound care?. *Diabetes Educ*. 2006;32(2):197-210.

33 Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest*. 2007 117(5):1219-22.

34 Hehenberger K, Heilborn J, Brismar K, Hansson K. Inhibited proliferation in fibroblasts derived from chronic diabetic wounds and in normal dermal fibroblasts treated with high glucose is associated with increased formation of l-lactate. *Wound Repair Regen*. 1998;6(2):135-41.

35 Roy S, Patel D, Khanna S, Gordillo GM, Biswas S, Friedman A, Sen CK. Transcriptome-wide analysis of blood vessels laser captured from human skin and chronic wound-edge tissue. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2007; 104(36):14472-7.

36 Loots MAM, Kenter SB, Au, FL, van Galen, WJM, Middelkoop E, Bos JD, Mekkes JR. 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(3):153-60.

37 Deveci, M, Gilmont RR, Dunham WR, Mudge BP, Smith DJ, Marcelo CL. Glutathione enhances fibroblast collagen contraction and protects keratinocytes from apoptosis in hyperglycemic culture. *Br J Dermatol.* 2005;152(2):217-24.

38 Bell E, Ivarsson B, Merill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1979;76(3):1274-8.

39 Carlson MA, Longaker MT. The fibroblast-populated collagen matrix as a model of wound healing: a review of the evidence.*Wound Repair Regen*. 2004;12(2):134-47.

40 Kamamoto F, Paggiaro AO, Rodas A, Herson MR, Mathor MB, Ferreira MC. A wound contraction experimental model for studying keloids and wound-healing modulators. *Artif Organs*. 2003;27:701-5.

41 Dallon JC, Erlich P. A review of fibroblast-populated collagen lattices. *Wound Repair Regen*. 2008;16:472-9.

42 Tomic-Canic M, Brem H. Gene array technology and pathogenesis of chronic wounds. *Am J Surg*. 2004;188(1A Suppl):67-72.

43 Duaggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet.* 1999;21(Suppl):10-4.

44 Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet*. 1999;21(Suppl):33-27.

45 Colombo J, Rahal P. A tecnologia de microarray em câncer de cabeça e pescoço. *R Bras Bioci*. 2010;8:64-72.

46 Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*. 1999;21(1 Suppl):10-4.

47 Cole J, Tsou R, Wallace K, Gibran N, Isik F. Comparison of normal human skin gene expression using cDNA microarrays. *Wound Repair Regen*. 2001;9(2):77-85.

48 Curto EV, Lambert GW, Davis RL, Wilborn TW, Dooley TP. Biomarkers of human skin cells identified using DermArray DNA arrays and new bioinformatics methods. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;291:1052–64.

49 Termini L, Boccardo E, Esteves GH, Hirata R Jr, Martins WK, Colo AE, Neves EJ, Villa LL, Reis LF.Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. *BMC Med Genomics*. 2008;27:21-9.

50 Hansen SL, Young DM, Boudreau NJ. HoxD3 expression and collagen synthesis in diabetic fibroblasts. *Wound Repair Regen*. 2003;11: 474-80.

51 Charles CA, Tomic-Canic M, Vincek V, Nassiri M, Stojadinovic O, Eaglstein WH, Kirsner RS. A gene signature of nonhealing venous ulcers: potencial diagnostic markers. *Am Acad Dermato.l* 2008; 59: 758-71.

52 Riedel K, Kremer T, Ryssel H, Riedel F, Goessler UR, Koellensperger E, Germann G, Sauerbier M. TGF-beta antisense oligonucleotides modulate expression of matrix metalloproteinases in isolated fibroblasts from radiated skin. *In Vivo*. 2008;22(1):1-7.

53 Derrick KL, Norbury K, Kieswetter K, Skaf J, McNulty AK. Comparative analysis of global gene expression profiles between diabetic rat wounds treated with vacuum-assisted closure therapy, moist wound healing or gauze undersuction. *Int Wound J*. 2008;5:615–624.

54 Klingbeil MFG. Comparação de dois métodos de obtenção celular para cultura primária de queratinócitos bucais humanos [dissertação]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, autarquia associada à Universidade de São Paulo; 2006.

55 Carrel A, Burrows MT. Cultivation of adult tissues and organs outside de body. *JAMA*. 1910;55:1379.

56 Prifti E, Zucker JD, Clement K, Henegar C. FunNet: an integrative tool for exploring transcriptional interactionsBioinformatics. 2008;24(22):2636-8.

57 Reiber GE, Lipsky BA, Gibbons GW. The burden of diabetic foot ulcers. *Am J Surg*. 1998;176(2A Suppl):5S-10S.

58 Hinchliffe RJ, Valk GD, Apelqvist J, Armstrong DG, Bakker K, Game FL, Hartemann-Heurtier A, Löndahl M, Price PE, van Houtum WH, Jeffcoate WJ. A systematic review of the effectiveness of interventions to enhance the healing of chronic ulcers of the foot in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008;24(Suppl 1):S119-44.

59 Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999; 341:738–46.

60 Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen*. 2001; 9:66-76.

61 Kiecolt-Glaser JK, Marucha PT, Malarkey WB, Mercado AM, Glaser R. Slowing of wound healing by psychological stress. *Lancet*. 1995; 346:1194-6.

62 Maier AB, Westendorp RG. Relation between replicative senescence of human fibroblasts and life history characteristics. Ageing Res Rev. 2009;8(3):237-43

63 Morocutti A, Earle KA, Rodemann HP, Viberti GC. Premature cell ageing and evolution of diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 1997;40:244-6.

64 Wall IB, Moseley R, Baird DM, Kipling D, Giles P, Laffafian I, Price PE, Thomas DW, Stephens P. Fibroblast dysfunction is a key factor in the non-healing of chronic venous leg ulcers. *J Invest Dermatol*. 2008;128(10):2526-40.

65 Sangmyung R. Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Exp Mol Med*. 2009; 41(12):858-65.

66 Wang Y, Joshi T, Zhang XS, Xu D, Chen L. Inferring gene regulatory networks from multiple microarray datasets. *Bioinformatics.* 2006;22(19):2413-20.

67 Bitar MS. Insulin and glucocorticoid-dependent suppression of the IGF-I system in diabetic wounds. *Surgery*. 2000;127(6):687-95.

68 Rai NK, Suryabhan, Ansari M, Kumar M, Shukla VK, Tripathi K. Effect of glycaemic control on apoptosis in diabetic wounds. *J Wound Care*. 2005;14:277–81.

69 Werner S, Reeden M, Hubner G, Greenhalgh 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;103:469-73.

70 Usui ML, Mansbridge JN, Carter WG, Fujita M, Olerud JE. Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. *J Histochem Cytochem*. 2008;56(7):687-96.

71 Wenk J, Foitzik A, Achterberg V, Sabiwalsky A, Dissemond J, Meewes C, Reitz A, Brenneisen P, Wlaschek M, Meyer-Ingold W, Scharffetter-Kochanek K. Selective pick-up of increased iron by deferoxamine-coupled cellulose abrogates the iron-driven induction of matrix-degrading metalloproteinase 1 and lipid peroxidation in human dermal fibroblasts in vitro: a new dressing concept. *J Invest Dermatol*. 2001;116(6):833-9.

72 Hodde JP, Johnson CE. Extracellular matrix as a strategy for treating chronic wounds. *Am J Clin Dermatol*. 2007;8(2):61-6.

73 Yates S, Rayner TE. Transcription factor activation in response to cutaneous injury: role of AP-1 in reepithelialization. *Wound Repair Regen*. 2002;10(1):5-15

74 Bokoch GM, Bohl BP, Chuang TH. Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins. *J Biol Chem*. 1994;269(50):31674-9.

75 Evers EE, Zondag GC, Malliri A, Price LS, ten Klooster JP, van der Kammen RA, Collard JG. Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *Eur J Cancer*. 2000;36(10):1269-74.

76 Kolodney M, Elson E. Contraction due to microtubule disruption is associated with increased phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:10252-6.

77 Yokouchi Y, Sakiyama J, Kameda T, Iba H, Suzuki A, Ueno N, Kuroiwa A. BMP - 2/ - 4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development (Cambridge, England).* 1996;122:3725-34.

78 Trousse F, Esteve P, Bovolenta P. Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye. J Neurosci 2001;21:1292-301.

79 Brubaker KD, Corey E, Brown LG, Vessella RL. Bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cell lines. *J Cell Biochem*. 2004;91:151-60.

80 Fukuda N, Saitoh M, Kobayashi N, Miyazono K. Execution of BMP - 4 - induced apoptosis by p53 - dependent ER dysfunction in myeloma and B - cell hybridoma cells. *Oncogene*. 2006;25:3509-17.

81 Darby IA, Bisucci T, Hewitson TD, MacLellan DG. Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29(1):191-200.

82 Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer*. 2002;2(10):777-85.

83 Care A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, Peschle C, Colombo MP. HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cell Biol*. 1996;16(9):4842-51.

84 Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer*. 2002;2(10):777-85.

85 Lei H, Wang H, Juan AH, Ruddle FH. The identification of Hoxc8 target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(7):2420-4.

86 Hjalt TA, Amendt BA, Murray JC. PITX2 regulates procollagen lysyl hydroxylase (PLOD) gene expression: implications for the pathology of Rieger syndrome. *J Cell Biol*. 2000;152(3):545-52.

87 Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(3):802-6.

88 Komi-Kuramochi A, Kawano M, Oda Y, Asada M, Suzuki M, Oki J, Imamura T. Expression of fibroblast growth factors and their receptors during full-thickness skin wound healing in young and aged mice. *J Endocrinol*. 2005;186:273-89.

89 Yamamoto T, Hartmann K, Eckes B, Krieg T. Mast cells enhance contraction of three-dimensional collagen lattices by fibroblasts by cell-cell interaction: role of stem cell factor/c-kit. *Immunology*. 2000;99(3):435-9.

90 Ishihara H, Yoshimoto H, Fujioka M, Murakami R, Hirano A, Fujii T, Ohtsuru A, Namba H, Yamashita S. Keloid fibroblasts resist ceramide-induced apoptosis by overexpression of insulin-like growth factor I receptor. *J Invest Dermatol.* 2000;115(6):1065-71.

91 Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res*. 2006;66(9):4795-801.

92 Gu Q, Gao Y, Li Y, Yang Z, Zhou J, Wang X, Wang D, Zhao P. Overexpression of p53 and MDM2 proteins in rat radiation-induced skin ulcers. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1999;18(4):319-22.

93 Zabel U, Weeger M, La M, Schmidt HH. Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem J*. 1998;335(1):51-7.

94 Antonova GN, Snead CM, Antonov AS, Dimitropoulou C, Venema RC, Catravas JD. Nitric oxide preconditioning regulates endothelial monolayer integrity via the heat shock protein 90-soluble guanylate cyclase pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(2):893-903.

95 Venable ME, Webb-Froehlich LM, Sloan EF, Thomley JE. Shift in sphingolipid metabolism leads to an accumulation of ceramide in senescence. *Mech Ageing Dev*. 2006;127(5):473-80.

96 Thon L, Möhlig H, Mathieu S, Lange A, Bulanova E, Winoto-Morbach S, Schütze S, Bulfone-Paus S, Adam D. Ceramide mediates caspase-independent programmed cell death. *FASEB J*. 2005;19(14):1945-56.

97 Sato M, Ishikawa O, Miyachi Y. Distinct patterns of collagen gene expression are seen in normal and keloid fibroblasts grown in three-dimensional culture. *Br J Dermatol*. 1998;138(6):938-43.

98 Siler U, Seiffert M, Puch S, Richards A, Torok-Storb B, Müller CA, Sorokin L, Klein G. Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. *Blood.* 2000;96(13):4194-203.

99 Fujiwara H, Kikkawa Y, Sanzen N, Sekiguchi K. Purification and characterization of human laminin-8. Laminin-8 stimulates cell adhesion and migration through alpha3beta1 and alpha6beta1 integrins. *J Biol Chem*. 2001;276(20):17550-8.