

CIBELE CRASTEQUINI GOMES

Efeitos da expressão de microRNA-31 induzida por concentração elevada de glicose sobre a migração e adesão de fibroblastos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

São Paulo

2021

CIBELE CRASTEQUINI GOMES

Efeitos da expressão de microRNA-31 induzida por concentração elevada de glicose sobre a migração e adesão de fibroblastos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento

Orientadora: Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos

Versão original

São Paulo

2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gomes, Cibele Crastequini

Efeitos da expressão de microRNA-31 induzida por
concentração elevada de glicose sobre a migração e
adesão de fibroblastos / Cibele Crastequini Gomes;
orientadora Marinilce Fagundes Santos. -- São
Paulo, 2021.

116 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Diabetes Mellitus. 2. MicroRNAs. 3. Migração
celular. 4. Hiperglicemia. 5. miR-31. I. Santos,
Marinilce Fagundes, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **933/2018** referente ao projeto intitulado: ***"Regulação do microRNA-31 (miR-31) e identificação de seus alvos em fibroblastos expostos a uma concentração elevada de glicose"*** sob a responsabilidade de ***Cibele Crastequini Gomes*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Marinilce Fagundes dos Santos***, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, foi analisado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo CEPSH - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 26 de fevereiro de 2018.


Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP


Prof. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

Ao meu filho Bento, com amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por esta oportunidade de crescimento e aprendizado.

Agradeço aos meus pais, Paulo e Rosana, e aos meus irmãos, Gabriela, Paulo Neto, Agatha e meu afilhado Samuel, pela minha educação e meus valores. Mesmo distantes, sempre tive o apoio e o amor de vocês. Obrigada.

Ao meu marido Rafael, pelo apoio, paciência, carinho, incentivo e companhia nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu filho Bento, meu maior presente e minha motivação para a conclusão desta tese.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos, pela oportunidade, pelos ensinamentos, apoio, e pelo grande exemplo de profissionalismo e dedicação.

À Dra. Cilene Rebouças de Lima, que me auxiliou desde o início desta jornada. Entre todas as contribuições, a maior delas foi o exemplo de dedicação.

Agradeço aos colegas de laboratório Douglas, Dayane, Marco, Lídia, Carol, Stefanie, Noemi, Julia e à técnica Gabriella Malheiros pela convivência, auxílio e aprendizado que me proporcionaram.

Agradeço a profa. Dra. Chao Yun Irene Yan e a Dra. Carolina Purcell Goes pela grande ajuda com os ensaios de luciferase.

Agradeço ao Mário C. Cruz e ao Iuri C. Valadão, especialistas do CEFAP, que me auxiliaram nos experimentos de adesão e migração celular.

Ao Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado, professor da graduação que me incentivou a seguir carreira acadêmica. Obrigada pelos ensinamentos e pela amizade.

A todos os membros do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB – USP, pelo apoio e convivência durante este período.

A todos, o meu mais sincero agradecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88882.377347/2019-01.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – 88882.377347/2019-01.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP por viabilizar financeiramente a execução desta tese (processo nº 2015/19645-7).

Agradeço ao Conselho nacional de Desenvolvimento de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por contribuir financeiramente para o desenvolvimento desta tese (processos 310714/2018-4 e 448052).

RESUMO

GOMES, C. C. **Efeitos da expressão de microRNA-31 induzida por concentração elevada de glicose sobre a migração e adesão de fibroblastos.** 2021. 116 f. Tese (Doutorado em Biologia de Sistemas). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Diabetes Mellitus (DM) é uma doença complexa, caracterizada pela hiperglicemia crônica. Muitas complicações estão associadas ao DM duradouro, dentre elas a cicatrização deficiente de feridas. O estresse oxidativo é um dos principais mecanismos envolvidos nas complicações do DM. Demonstramos previamente que células expostas a uma concentração elevada de glicose (HG) apresentam menor velocidade, maior número de protrusões celulares simultâneas e não produtivas (retráteis) e direcionalidade reduzida, por mecanismos que envolvem agentes oxidantes. MicroRNAs são reguladores pós-transcricionais da expressão gênica que promovem a degradação de mRNAs alvo, ou bloqueiam sua tradução. Alguns microRNAs podem afetar a migração celular, como o miR-31. A expressão de miR-31 está aumentada em fibroblastos sob condições hiperglicêmicas (in vivo e in vitro), por mecanismos relacionados ao estresse oxidativo. A superexpressão de miR-31 em fibroblastos aumentou o número de protrusões celulares improdutivas e simultâneas e reduziu a direcionalidade de migração, sem afetar a velocidade celular. O objetivo deste estudo foi elucidar os mecanismos pelos quais o miR-31 afeta a migração de fibroblastos em condições que simulam, in vitro, a normoglicemia e a hiperglicemia. Para isso, fibroblastos da linhagem NIH-3T3 foram cultivados em baixa concentração de glicose (5 mM) ou HG (30 mM) durante 3 dias. O papel de espécies reativas de oxigênio (EROs) na migração foi avaliado com a adição do antioxidante N-acetil cisteína (NAC) ao meio. Experimentos funcionais foram realizados após superexpressão (com miR mimic) ou supressão (com anti-miR) de miR-31-5p. A expressão de miR-31 foi estudada por PCR em tempo real e o comportamento migratório foi avaliado por time-lapse. A dinâmica de adesões (número, tamanho, circularidade, classificação e localização) foi estudada por microscopia TIRF em células transfectadas com paxilina fluorescente. A expressão de alvos potenciais foi estudada por western blotting e a validação dos alvos foi feita por ensaios de luciferase. Os resultados mostraram que a supressão de miR-31 reduziu a velocidade celular e aumentou a direcionalidade de migração, aumentando a estabilidade de

protrusões e a formação de feixes contráteis de actina e miosina II. Semelhante à HG, a superexpressão de miR-31 reduziu o número e tamanho das adesões, com predominância de adesões nascentes (imaturas) sobre a fibronectina. A supressão de miR-31 promoveu a maturação das adesões, aumentando o número e tamanho de adesões focais, sem influenciar a formação de novas adesões. HG reduziu a expressão de ROCK1 e Radixina, sem alterar ROCK2 e integrina $\alpha 5$, por mecanismo dependente de EROs. A superexpressão de miR-31 reduziu a expressão de ROCK1, ROCK2 e Radixina, enquanto a supressão de miR-31 teve o efeito contrário. Radixina foi identificada como alvo direto de miR-31, enquanto ROCK1 foi identificada como alvo indireto. Conclusão: A expressão aumentada de miR-31 em fibroblastos expostos a uma concentração elevada de glicose, estimulada por EROs e tendo como alvos a Radixina (direto) e ROCK1 (indireto), prejudica a migração por diminuição da maturação de adesões celulares junto à matriz extracelular, causando uma perda na estabilidade dos lamelipódios e diminuição da persistência direcional da migração, além de reduzir a contratilidade celular.

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

ABSTRACT

GOMES, C. C. **Effects of high glucose induced-expression of microRNA-31 on fibroblasts adhesion and migration**. 2021. 116 f. Thesis (PhD in Life Systems Biology). Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

Diabetes Mellitus (DM) is a complex disease characterized by chronic hyperglycemia. Several complications are associated with long-term DM, including impaired wound healing. Oxidative stress is one of the major mechanisms involved in such complications. We have previously demonstrated that cells exposed to high glucose concentrations (HG) show reduced velocity, increased number of simultaneous unproductive (retractile) cellular protrusions, and reduced directionality by mechanisms involving oxidizing agents. MicroRNAs are post-transcriptional regulators of gene expression that promote the degradation of target mRNAs or block their translation. Some microRNAs modulate cell migration, such as miR-31. MiR-31 expression is increased in fibroblasts under hyperglycemic conditions (in vivo and in vitro) by mechanisms related to oxidative stress. Superexpression of miR-31 in fibroblasts increased the number of unproductive simultaneous cell protrusions and reduced cellular directionality during migration, without effects on cell velocity. This study aimed to elucidate the mechanisms underlying miR-31 effects on cell migration under in vitro conditions that simulate normoglycemic and hyperglycemic environments. NIH-3T3 fibroblasts were cultured in a medium containing a physiological glucose concentration (5 mM) or HG (30 mM) for 3 days. The role of reactive oxygen species (ROS) on cell migration was assessed by adding the antioxidant N-acetyl cysteine (NAC) to the medium. Functional experiments were performed by superexpression (using miR mimic) and suppression (using anti-miR) of miR-31-5p. MiR-31 expression was measured by real-time PCR, whereas migratory behavior was studied using time-lapse videos. Adhesion dynamics (size, circularity, characterization, and localization) were studied by TIRF microscopy after cell transfection with fluorescent Paxillin, a cell adhesion protein. Protein expression of potential miR-31 targets was analyzed by western blotting, and target validation was performed by luciferase assays. Results showed that the suppression of miR-31 reduced cell velocity and increased cell directionality, improving cellular protrusions stability as well as the formation of intracellular actomyosin contractile bundles (stress fibers). Similar to HG, the overexpression of miR-31 reduced the number and size of adhesions to fibronectin,

with the predominance of nascent immature adhesions over mature focal adhesions (almost inexistent). The suppression of miR-31 promoted adhesion maturation, increasing the number and size of focal adhesions without effects on new adhesions formation. HG reduced the expression of ROCK1 and Radixin, without effects on ROCK2 and $\alpha 5$ integrin, through a ROS-dependent mechanism. Superexpression of miR-31 also reduced ROCK1, ROCK2, and Radixin expression, while miR-31 suppression produced the opposite results. Radixin was validated as a direct target of miR-31, whereas ROCK1 was identified as an indirect target. Conclusion: ROS-dependent increased miR-31 expression in fibroblasts exposed to a high glucose concentration, through its targets Radixin (direct) and ROCK1 (indirect), impair cell migration by reducing cell contractility, inhibiting adhesion maturation to the extracellular matrix, impairing lamellipodia stability, and reducing directional migration persistence.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Produção do ânion superóxido pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.....	26
Figura 2- A superprodução de ânion superóxido pela mitocôndria inibe a atividade de GAPDH.....	27
Figura 3- A sinalização RhoA/ROCKs promove a contratilidade celular.....	36
Figura 4- Análise da direcionalidade de migração celular.....	50
Figura 5- Construção dos plasmídeos de Radixina e ROCK 1 para validação de alvos do miR-31.....	54
Figura 6- A elevada concentração de glicose reduz a expressão proteica de ROCK 1 e RDX, sem alterar a expressão de ROCK 2 e Integrina $\alpha 5$ em células NIH-3T3.....	58
Figura 7- Superexpressão de miR-31-5p em linhagem NIH-3T3.....	59
Figura 8- A superexpressão de miR-31-5p em células NIH-3T3 reduz a expressão proteica de ROCK 1, ROCK 2 e RDX, mas não altera a expressão de integrina $\alpha 5$.....	60
Figura 9- Supressão de miR-31-5p em linhagem NIH-3T3.	62
Figura 10- A supressão de miR-31-5p não alterou a velocidade celular e aumentou a direcionalidade de células NIH-3T3 do grupo controle	63
Figura 11- A supressão de miR-31-5p em células NIH-3T3 cultivadas com glicose elevada reduz o número de protrusões formadas e aumenta a sua estabilidade	65

Figura 12- A supressão de miR-31-5p em células NIH-3T3 promove a formação de fibras de estresse e aumenta o tamanho das células.....	67
Figura 13- A supressão de miR-31-5p em células NIH-3T3 aumenta a expressão proteica de ROCK 1, ROCK 2 e RDX.....	69
Figura 14- Super expressão de miR-31-5p em linhagem NIH-3T3 para o ensaio de luciferase.....	71
Figura 15- Ensaio de luciferase para validação de ROCK 1	71
Figura 16- Ensaio de luciferase para validação de Radixina	72
Figura 17- A elevada concentração de glicose reduz o número de adesões em células NIH-3T3 por mecanismos que envolvem agentes oxidantes.	74
Figura 18- A concentração elevada de glicose reduz o tamanho e aumenta a circularidade das adesões, por mecanismos que envolvem agentes oxidantes	75
Figura 19- A concentração elevada de glicose aumenta a proporção de adesões nascentes em relação às adesões focais em células NIH-3T3 por mecanismos que envolvem agentes oxidantes	76
Figura 20- A concentração elevada de glicose reduz o tamanho das adesões nascentes e aumenta sua circularidade em células NIH-3T3, por meio de mecanismos que envolvem agentes oxidantes	77
Figura 21- A concentração elevada de glicose reduz o tamanho das adesões focais e aumenta sua circularidade em células NIH-3T3, por meio de mecanismos que envolvem agentes oxidantes	77
Figura 22- A concentração elevada de glicose reduz drasticamente a existência de adesões focais em células NIH-3T3, por meio de mecanismos que envolvem agentes oxidantes	78

Figura 23- A super expressão de miR-31 reduz o número de adesões em células NIH-3T3.....	79
Figura 24- A super expressão do miR-31 reduz o tamanho e aumenta a circularidade das adesões em células NIH-3T3.	80
Figura 25- A super expressão de miR-31 elimina as adesões focais em células NIH-3T3.....	81
Figura 26- A super expressão do miR-31 reduz o tamanho e aumenta a circularidade das adesões nascentes em células NIH-3T3	82
Figura 27- A super expressão do miR-31 elimina as adesões focais em células NIH-3T3.....	82
Figura 28- A super expressão do miR-31 elimina as adesões focais em células NIH-3T3.....	83
Figura 29- A supressão de miR-31 não altera o número de adesões em células NIH-3T3, independentemente da concentração de glicose no meio	84
Figura 30- A supressão de miR-31 reduz a circularidade e aumenta o tamanho das adesões em células NIH-3T3 expostas a uma concentração elevada de glicose	85
Figura 31- A supressão de miR-31 aumenta a maturação das adesões em células NIH-3T3 expostas a uma concentração elevada de glicose	86
Figura 32- A supressão de miR-31 aumenta o tamanho e reduz a circularidade das adesões nascentes em células NIH-3T3, independentemente da concentração de glicose	88
Figura 33- A supressão de miR-31 aumenta o tamanho e reduz a circularidade das adesões focais em células NIH-3T3 expostas a uma concentração elevada de glicose	89

Figura 34- A supressão de miR-31 aumenta o tamanho e reduz a circularidade das adesões focais em células NIH-3T3 expostas a uma concentração elevada de glicose.90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-coA - acetilCoenzima A

AGEs – *Advanced Glycation End Products*, produtos finais de glicação avançada

AGO – proteína *Argonaute*

Arp 2/3 – *Actin-Related proteins complex*

ATP – *Adenosine triphosphate*, Trifosfato de adenosina

CAT – Catalase

Cdc42 - *Cell division control protein 42 homolog*

DAG – Diacilglicerol

DM – Diabetes mellitus

DNA - *Deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

ERK - *Extracellular Signal-Regulated Kinase*

ERM - *Ezrin/Radixin/Moesin protein family*

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

Exp5 – *Exportin 5*

FADH₂ – *Flavin adenine dinucleotide*, Dinucleotídeo de adenina e flavina

FN – Fibronectina

GAP – *GTPase-Activating Protein*, proteína de ativação de GTPase

GDI – *Guanosine Nucleotide Dissociation Inhibitor*

GDP – Guanosina difosfato

GEF – *Guanine Nucleotide Exchange Factor*, fatores de troca de nucleotídeos de guanina

GLUT – *Glucose Transporter*, transportador de glicose

Gpx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione

GTP – Guanosine triphosphate

HG – *High Glucose*

HIF - *Hypoxia-Inducible Factors*

hMSC - *Human Mesenchymal Stem Cells*

ITGA5 – gene para subunidade $\alpha 5$ de integrina

LG – *Low Glucose*

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinases*

MEC – Matriz extracelular

MLC - *Myosin Light Chain*

MLCK - *Myosin Light-Chain Kinase*

MMPs – *Matriz Metalloproteinases*

MnSOD - *Manganese Superoxide Dismutase*

M-RIP – *Myosin phosphatase Rho-Interacting Protein*

NAC – N-acetilcisteína

NAD – Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

NEAA – Aminoácidos não essenciais

NF-KB - *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NHF - *Normal Human Fibroblasts*

PFA – Paraformaldeído

Pre-miRNA – miRNA precursor

Pri-miRNA – miRNA primário

Rac1 – *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

RAGEs – Receptor de AGEs

Ran – *Ras-related Nuclear protein; GTP-binding nuclear protein Ran*

RDX – Radixina

Rho - *Ras homologous protein family*

RhoA – *Ras homology gene family member A*

RISC – *RNA-Induced Silencing Complex*

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA-pol II - RNA polimerase II

ROCK - *Rho-associated protein kinase*

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

SFB – Soro Fetal Bovino

SOD – Superóxido Dismutase

T1DM – Diabetes Mellitus tipo 1

T2DM – Diabetes Mellitus tipo 2

TGF- β – *Transforming growth factor β*

UCP - *Uncoupling Protein*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	Diabetes Mellitus e suas complicações.....	23
1.2	Captação e metabolismo da glicose	24
1.3	Hiperglicemia e a produção de EROs	25
1.4	Estresse oxidativo	27
1.5	Defesa antioxidante.....	29
1.6	N –acetil-cisteína	30
1.7	Fibroblastos e o processo cicatricial.....	32
1.8	cicatrização de feridas e alterações metabólicas do DM	33
1.9	Migração celular	34
1.10	Migração celular e glicose elevada	37
1.11	MicroRNAs	38
1.12	MicroRNAs e Diabetes Mellitus	39
1.13	MicroRNAs e migração celular	42
1.14	MiR-31, estresse oxidativo e migração celular – resumo dos resultados anteriores	43
2	OBJETIVOS	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	Cultura de linhagem de fibroblastos – NIH-3T3	46
3.2	Cultura de linhagem de fibroblastos – NIH-3T3 em presença de antioxidante N-acetil cisteína (NAC).....	46
3.3	Ensaio funcionais in vitro após superexpressão e supressão do miR-31-5p	47
3.3.1.	Superexpressão do miR-31 em células NIH-3T3.....	47
3.3.2.	Supressão com anti-miR-31 em células NIH-3T3.....	48

3.4	Extração de RNA total e análise da expressão dos miR-31-5p por RT-PCR	49
3.5	Ensaio de vídeo microscopia (<i>time-lapse</i>) para avaliação da migração celular.....	50
3.6	Caracterização do citoesqueleto de F-actina	51
3.7	Análise <i>in silico</i> de potenciais alvos preditos do miR-31-5p por Bioinformática	51
3.8	Análise de expressão proteica por Western Blotting	52
3.9	Construção de plasmídeo repórter contendo o sítio de ligação do miR-31 e ensaio de luciferase	52
3.10	Transfecção com plasmídeo paxillin-eGFP e análise de adesões por microscopia TIRF	55
3.11	Análise estatística	56
4	RESULTADOS	57
4.1	A concentração elevada de glicose reduz a expressão proteica de ROCK 1 e RDX em células NIH-3T3, sem alterar a expressão de ROCK 2 e da subunidade $\alpha 5$ de integrina	57
4.2	A superexpressão de miR-31 reduz a expressão proteica de ROCK 1, ROCK 2 e RDX e não altera a expressão de integrina $\alpha 5$	59
4.3	Supressão de miR-31	61
4.3.1.	A supressão de miR-31 aumenta a direcionalidade celular e diminui a velocidade de migração	62
4.3.2.	A supressão de miR-31 aumenta a estabilidade das protrusões de membrana e a formação de fibras de estresse nas células	64
4.3.3.	A supressão de miR-31 aumenta a expressão proteica de ROCK 1, ROCK 2 E RDX	68
4.4	Padronização e Ensaio de luciferase	70
4.4.1.	ROCK 1 é alvo indireto de miR-31-5p.....	71
4.4.2.	Radixina é alvo direto de miR-31-5p	72
4.5	Padronização da transfecção com paxillin-eGFP, e estudo da maturação de adesões focais por microscopia TIRF	73

4.5.1. A exposição a uma elevada concentração de glicose prejudica a formação e a maturação de adesões em células NIH-3T3, por um mecanismo dependente de agentes oxidantes	73
4.5.2. A super expressão de miR-31 em NIH-3T3 prejudica a formação e a maturação de adesões.....	79
4.5.3. A supressão de miR-31 em NIH-3T3 aumenta a maturação de adesões, sem influenciar na formação de novas adesões	83
5 DISCUSSÃO	92
6 CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus e suas complicações

O Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de desordens metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia crônica. Cerca de 463 milhões de pessoas no mundo apresentam esta desordem (*International Diabetes Federation, 2019*). No Brasil, cerca de 8,1% da população tem diabetes (*World Health Organization - WHO, 2016*). Além do impacto na qualidade de vida do paciente, o diabetes também gera altos custos para o sistema público de saúde, por sua natureza crônica e suas complicações a longo prazo.

Existem dois tipos principais de Diabetes Mellitus: tipo 1 (T1DM) e tipo 2 (T2DM), de acordo com a patofisiologia da doença (WHO, 2019). No T1DM (insulina-dependente) ocorre a destruição imunológica das células beta pancreáticas, e conseqüentemente a insulina não é produzida pelo pâncreas. Tem como causa principal a predisposição genética, relacionado aos genes codificantes de HLA (*Human leukocyte antigen*), uma molécula apresentadora de antígenos que é reconhecida por linfócitos T, desencadeando uma resposta autoimune (Atkinson & Maclaren, 1994). Esta forma é a mais comum em crianças e adolescentes, e é responsável por ~5% de todos os casos de diabetes. Apresenta sintomas bem definidos, tais como poliúria, polidipsia e perda de peso (*American Diabetes Association, 2009*).

Já o T2DM (insulina-independente) resulta da incapacidade do organismo de responder apropriadamente à insulina produzida (resistência à insulina). O tipo II tem sintomatologia menos evidente, o que leva com frequência a um diagnóstico tardio, apenas quando suas complicações já estão presentes. É o tipo mais comum, presente em 90% dos casos, e acomete principalmente adultos. Ambos os tipos são doenças complexas e causadas por vários fatores, incluindo a predisposição genética e fatores ambientais (WHO, 2019).

Todos os tipos de DM se desenvolvem tendo como característica em comum a hiperglicemia. O aumento dos níveis de glicose no sangue e de sua captação e metabolismo por diferentes tipos celulares é o principal fator causador dos danos teciduais que levam às complicações a longo prazo observadas nesta doença, tais como a retinopatia e perda de visão, relacionada principalmente ao dano nos vasos

sanguíneos; neuropatia diabética, que pode levar ao acidente vascular cerebral; arteriosclerose e doença vascular periférica, insuficiência renal e a deficiência na cicatrização de feridas, que contribui para a ocorrência de feridas crônicas (*American Diabetes Association, 2009*).

1.2 Captação e metabolismo da glicose

A glicose ($C_6H_{12}O_6$) é um monossacarídeo classificado como uma aldohexose, utilizado pelas células como fonte de energia química. Sua degradação em células procariontes e eucariontes é realizada através do processo de respiração celular, e a energia produzida neste processo é utilizada para a síntese de moléculas de adenosina trifosfato (ATP), produzindo ainda gás carbônico e água. Em seguida, estas moléculas são utilizadas pela célula em suas múltiplas funções que requerem gasto de energia.

O nível basal de glicose no sangue é em torno de 5 mM (90 mg/dl). Para a manutenção deste nível, a captação de glicose pelos tecidos pode ocorrer através de difusão facilitada ou transporte ativo, de acordo com a necessidade metabólica e com a disponibilidade de glicose (Sharma et al., 2017). A difusão facilitada acontece através de transportadores GLUT (*Glucose transporter*). As isoformas dos transportadores GLUT variam de acordo com sítio de expressão, assim como sua especificidade ao substrato (hexoses) e cinética de transporte. Existem 14 isoformas de transportadores GLUT codificadas pelo genoma humano, e sua expressão é regulada em diferentes condições fisiológicas e patológicas (Gould & Holman, 1993; Mueckler & Thorens, 2013; Navale & Paranjape, 2016). Entre estas isoformas, tem destaque GLUT 4 e GLUT 1.

GLUT 4 é dependente de insulina e é responsável pelo transporte de glicose em adipócitos e células musculares. É altamente conservado, com 95% de homologia entre humanos e ratos. Já GLUT 1 é independente de insulina e é amplamente distribuído em vários tecidos, incluindo os tecidos em que está presente o GLUT 4, destacando-se sua presença em células beta pancreáticas, eritrócitos e em células endoteliais. É altamente conservado, com 98% de homologia entre humanos e ratos (Mueckler & Thorens, 2013; Navale & Paranjape, 2016).

Uma vez no meio intracelular, a glicose é fosforilada por uma família de

enzimas chamadas de hexocinases, formando glicose-6-fosfato. No citoplasma ocorre a glicólise, uma cadeia de dez reações catalisadas por enzimas específicas onde a glicose é oxidada gerando duas moléculas de piruvato, além de duas moléculas de ATP e NADH⁺ (*Nicotinamide adenine dinucleotide* – NAD, na sua forma reduzida), que serão introduzidas na cadeia respiratória ou na fermentação. Em aerobiose, o piruvato entra na mitocôndria e, por ação da piruvato desidrogenase, é convertido em acetil coenzima A (acetil-coA); e na matriz mitocondrial é oxidado no ciclo do ácido tricarboxílico, produzindo CO₂, H₂O, NADH E FADH₂.

A cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é formada por cinco complexos proteicos (I, II, III, IV e ATP sintase), ligados à membrana interna das cristas mitocondriais, que são responsáveis por transportar elétrons através de reações de óxido-redução (Figura 1). Neste processo, as moléculas de NADH e FADH₂ fornecem elétrons para o complexo I (NADH ubiquinona redutase) e para o complexo II (succinato desidrogenase), respectivamente. NADH e FADH₂ são responsáveis por gerar um fluxo de elétrons em um único sentido dentro da cadeia transportadora mitocondrial, na membrana interna desta organela.

Na etapa seguinte, os elétrons de ambos os complexos são transportados para a coenzima Q e, em seguida, são transferidos para o complexo III (ubiquinol–citocromo C redutase), citocromo C, complexo IV (citocromo C oxidase) e, finalmente, para o oxigênio molecular, sendo reduzido à H₂O.

A passagem de elétrons através dos complexos da cadeia faz com que seja gerado um gradiente eletroquímico, transportando prótons para fora da matriz mitocondrial em direção ao espaço intermembranas, e gerando uma diferença de potencial. A energia deste gradiente eletroquímico (força próton-motriz) é utilizada na síntese de ATP pela ATP sintase. Através do transporte de prótons a favor do seu gradiente eletroquímico para dentro da matriz mitocondrial, a ATP sintase converte trabalho mecânico em energia química, que é utilizada na síntese do ATP (Bonora et al., 2012).

Alternativamente, as proteínas de desacoplamento (UCPs) podem reduzir o gradiente de tensão, gerando calor e mantendo a taxa de produção de ATP constante (Figura 1) (Brownlee, 2005).

1.3 Hiperglicemia e a produção de EROs

A captação de glicose por muitos tipos celulares ocorre por difusão facilitada sendo, portanto, mais afetada pela alta concentração de glicose no sangue e independente da insulina circulante. Este tipo de captação de glicose ocorre principalmente nos tecidos mais suscetíveis às complicações a longo prazo do diabetes como o tecido nervoso, endotélio vascular, retina e rins, fazendo com que a concentração intracelular de glicose aumente (Sivitz & Yorek, 2010).

A maior quantidade de glicose intracelular aumenta a produção de piruvato no ciclo do ácido tricarboxílico, e conseqüentemente, a disponibilidade dos doadores de elétrons NADH e FADH₂. Estes doadores são consumidos na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, aumentando o fluxo de elétrons e a saída de prótons. Como resultado, o gradiente eletroquímico da membrana interna mitocondrial aumenta até que um limite crítico é alcançado, e a transferência de elétrons no complexo III é bloqueado, causando o retorno dos elétrons à coenzima Q, que doa estes elétrons ao oxigênio molecular, gerando o ânion superóxido (Figura 1) (Turrens, 2003; Brownlee, 2005; Rolo & Palmeira, 2006).

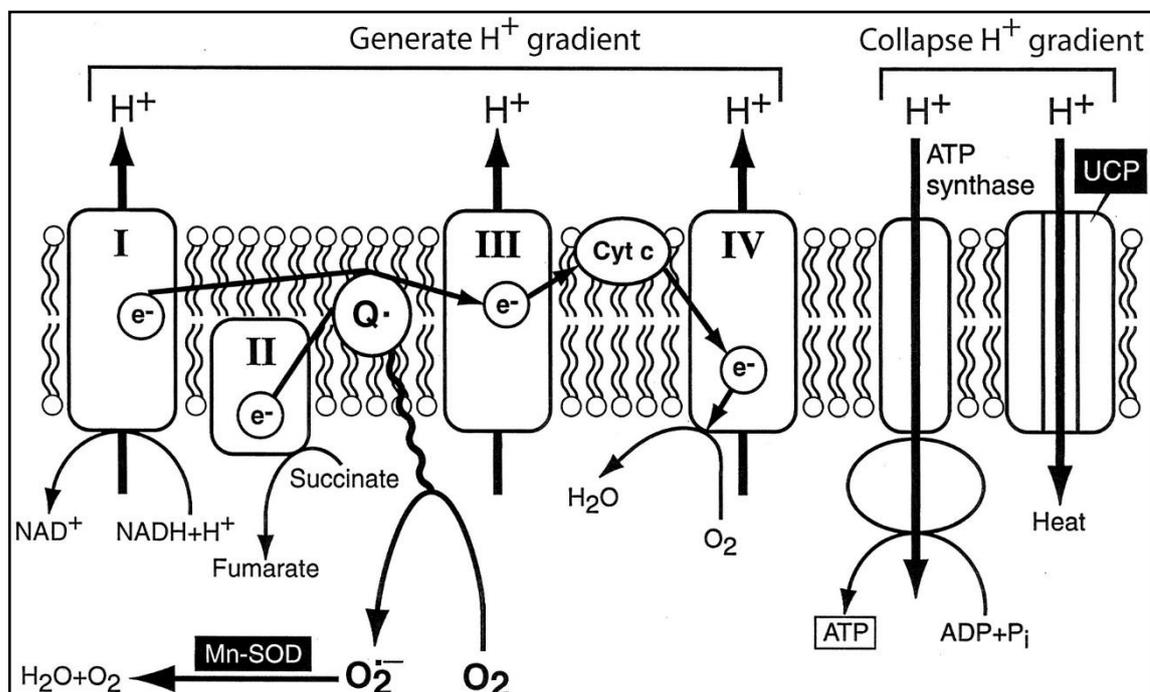


Figura 1. Produção do ânion superóxido pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. The Pathobiology of Diabetic Complications - A Unifying Mechanism. Michael Brownlee.

Através deste mecanismo, a maior geração de EROs reduz a atividade da

enzima gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH), levando ao acúmulo de todos os metabólitos anteriores da via glicolítica, e conseqüentemente a ativação de vias paralelas, tais como: 1) Aumento do fluxo de glicose e de outros açúcares pela via dos polióis; 2) Superativação da via das hexosaminas; 3) Ativação de isoformas da proteína cinase C (PKC); e 4) Aumento da formação intracelular de AGEs (*advanced glycation end products*) e na expressão de seus receptores nas células (RAGEs). A ativação destas vias altera a expressão gênica, aumenta ainda mais a produção de EROs e reduz a capacidade antioxidante intracelular, causando o estresse oxidativo e levando às complicações a longo prazo do diabetes (Giacco & Brownlee, 2010).

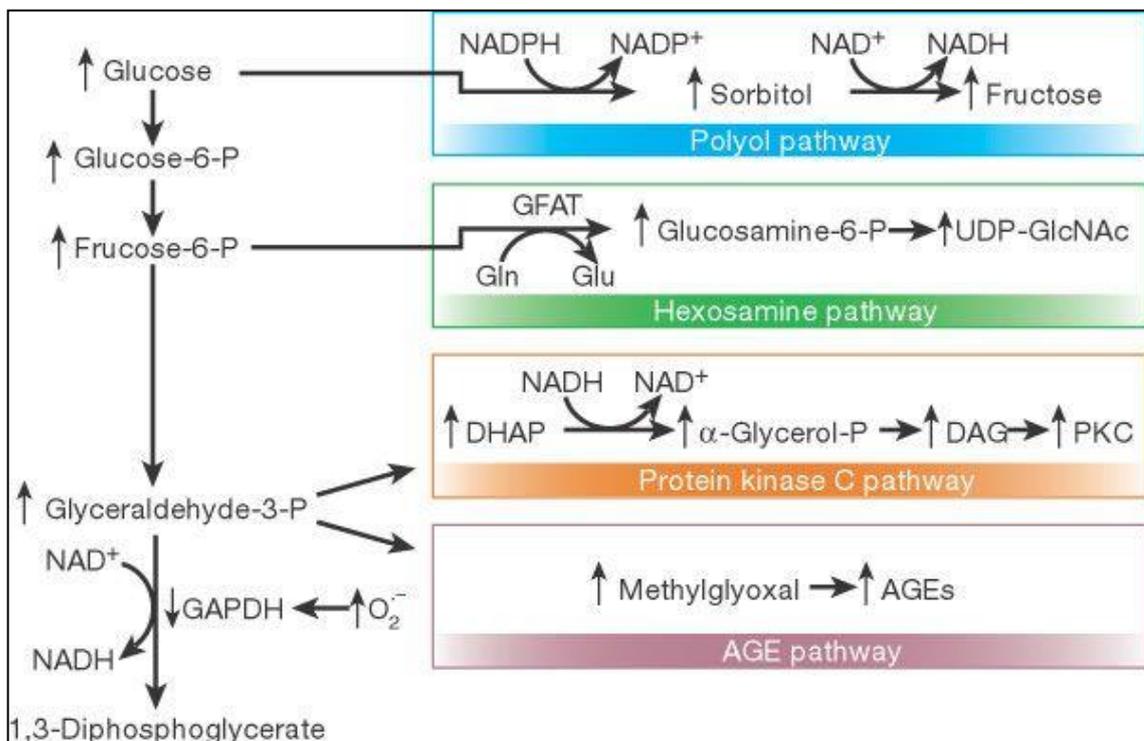


Figura 2. A superprodução de ânion superóxido pela mitocôndria inibe a atividade de GAPDH, e desta forma, ativa as vias principais de dano tecidual causado pela hiperglicemia. From Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.

1.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção de EROs e o sistema antioxidante de células e tecidos. Ocorre devido à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e outros radicais livres, criando um ambiente intracelular pró-oxidativo.

Em condições fisiológicas, os EROs servem como moléculas de sinalização que regulam processos biológicos, constituindo a via de sinalização redox, ou ainda podem ativar fatores de transcrição, levando à adaptação da célula ao estresse. Em condição de estresse oxidativo, no entanto, os EROs causam modificações estruturais e funcionais de proteínas, lipídios e DNA, alterando sua função e causando prejuízo a diferentes processos importantes para a homeostase celular (Martindale & Holbrook, 2002; Birben et al., 2012; Sena & Chandel, 2012).

Os EROs incluem os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (OH^{\bullet}), todos com propriedades químicas que conferem reatividade a diferentes moléculas. O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é produzido na redução de oxigênio por um elétron e é precursor da maioria dos EROs. As enzimas antioxidantes superóxido dismutases 1 e 2 (SOD 1 e 2) catalisam a dismutação do $O_2^{\bullet-}$, produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ser reduzido totalmente a H_2O ou parcialmente ao radical hidroxil (OH^{\bullet}), um potente oxidante (Brownlee, 2005; Kurutas, 2016; Birben et al., 2012).

O $O_2^{\bullet-}$ pode ainda reagir com outros radicais, como o óxido nítrico ($^{\bullet}NO$), produzindo peroxinitrato, outro poderoso oxidante. Também pode reagir com dióxido de carbono para gerar peroxicarbonato nitroso, que degrada rapidamente, formando um radical carbonato e um radical dióxido de nitrogênio. Os agentes oxidantes derivados do óxido nítrico são chamados de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), e podem causar peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, nitração de proteínas e inativação de enzimas (Patel et al., 1999; Kurutas, 2016).

Como citado anteriormente, EROs elevados também atuam como moléculas sinalizadoras na manutenção de funções fisiológicas (Sena & Chandel, 2012). No entanto, o aumento na produção e acúmulo do ânion superóxido está mais associado ao estresse oxidativo do que à sinalização redox fisiológica. O ânion superóxido não danifica indiscriminadamente as proteínas. Há um conjunto específico de proteínas susceptíveis à inativação ou ativação por superóxido, que agem em vias de sinalização específicas, promovendo adaptação ao superóxido elevado ou, alternativamente, iniciando a morte celular (Chen et al., 2009; Birben et al., 2012; Kurutas, 2016).

O estresse oxidativo na condição de hiperglicemia tem papel central na patogênese de várias complicações diabéticas. A maior geração de EROs e a concomitante redução das defesas antioxidantes intensificam o desequilíbrio redox

intracelular, causando importantes alterações na célula (Giacco & Brownlee, 2010; Asmat et al., 2015; Newsholme et al., 2016, 2019; Jha et al., 2016). Portanto, o estudo de terapias antioxidantes tem particular interesse para o tratamento das complicações a longo prazo do DM.

1.5 Defesa antioxidante

Enzimas antioxidantes são responsáveis por degradar EROs gerados no ambiente intracelular, ou impedindo a sua formação e consequente produção de outros radicais livres. Três principais enzimas formam a primeira linha de defesa antioxidante intracelular, cuja ação é a de catalisar a decomposição de EROs: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX), que diferem entre si quanto à estrutura, distribuição em diferentes tecidos e cofatores requeridos para o seu funcionamento (Kurutas, 2016; Szaleczky et al., 1999, Rahimi et al., 2005).

A SOD é uma metaloproteína que catalisa dismutação do radical superóxido, formando peróxido de hidrogênio e oxigênio. SOD1 está localizada principalmente no citosol e no espaço intermembranar mitocondrial, enquanto a SOD2 está localizada na matriz mitocondrial. A catalase é uma enzima encontrada em peroxissomos em eucariotos, que degrada peróxido de hidrogênio produzindo água e oxigênio. GPX é uma enzima que tem como substrato a glutathiona reduzida (GSH), que é oxidada a glutathiona oxidada (GSSH). GPX usa o GSH como um doador específico de hidrogênio para reduzir produtos da peroxidação lipídica (hidroperóxidos lipídicos) aos seus álcoois correspondentes, e reduzir o peróxido de hidrogênio livre, formando água (Kurutas, 2016; Szaleczky et al., 1999, Rahimi et al., 2005).

A segunda linha de defesa antioxidante intracelular é responsável por neutralizar ou eliminar radicais livres doando elétrons a eles e, no processo, formam outros radicais livres, que são facilmente neutralizados por outros antioxidantes desse grupo. Pertencem a este grupo os antioxidantes hidrofílicos, tais como: ácido ascórbico, ácido úrico e glutathiona; e os lipofílicos: alfa tocoferol (vitamina E) e ubiquinol (Kurutas, 2016).

A regulação da atividade enzimática antioxidante em organismos eucariotos pode ser influenciada por uma série de condições fisiológicas e patológicas. No DM,

as alterações metabólicas podem causar um desequilíbrio no balanço pró-oxidante – antioxidante de diversas formas. A hiperglicemia aumenta a ligação da glicose às proteínas, esta reação não enzimática é conhecida como glicação. A glicação causa alterações estruturais e funcionais nas proteínas, como hemoglobina, albumina, colágeno e membranas basais dos glomérulos, por exemplo, além de causar alterações funcionais das enzimas antioxidantes (Szaleczky et al., 1999, Rahimi et al., 2005; Memisoğullari et al., 2003; Vessby et al., 2002).

O DM também pode afetar a atividade de enzimas antioxidantes alterando a disponibilidade de micronutrientes, que funcionam como cofatores para a atividade enzimática antioxidante. No DM são comuns os baixos níveis de ascorbato, glutatona e SOD (Giacco; Brownlee, 2010; Szaleczky et al., 1999, Rahimi et al., 2005; Memisoğullari et al., 2003; Vessby et al., 2002). Alguns antioxidantes não-enzimáticos têm sido amplamente estudados para a prevenção e tratamento de doenças resultantes de dano oxidativo, como o DM. Antioxidantes como polifenóis, ácido ascórbico, vitamina A, ácido alfa-lipóico, tioredoxina, glutatona, melatonina, coenzima Q, beta-carotenóides, alfa-tocoferóis e, também enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidases, glutatona redutases e glutatona-s-transferases, têm se mostrado eficazes na prevenção do dano oxidativo ou em seu reparo em diferentes doenças (Kurutas, 2016; Ighodaro & Akinloye, 2019).

Diversos estudos têm mostrado que o uso de antioxidantes no tratamento do DM é eficaz em prevenir ou tratar as complicações desta doença (Aktunc et al., 2010; Goldibi et al., 2011; Ceriello et al., 2016; Zayed et al., 2017). Pessoa (2014) mostrou que a administração sistêmica ou tópica dos antioxidantes vitaminas C e E a camundongos diabéticos acelerou a cicatrização de ferida cutânea, modulando a inflamação tanto na fase precoce quanto na fase tardia da cicatrização. Sendo assim, o uso de antioxidantes no tratamento de feridas crônicas no DM é um método que tem se mostrado eficaz em diferentes modelos experimentais.

1.6 N –acetil-cisteína

A N-acetil-cisteína (NAC - $C_5H_9NO_3S$) é um potente antioxidante, derivado do aminoácido L-cisteína. É um composto aprovado pela FDA (*Food and Drug*

Administration) dos EUA para uso clínico como mucolítico, e é frequentemente usado como um tratamento eficaz para a toxicidade do acetaminofeno (paracetamol), restaurando as reservas de glutathiona hepática (Samuni et al., 2013).

Sua atividade antioxidante *in vivo* pode ser direta ou indireta. O efeito antioxidante direto se dá em relação a certas espécies oxidantes como NO₂ resultante do processo inflamatório, e o ácido hipocloroso (HOCl) e espécies relacionadas, produzidos por neutrófilos e monócitos (Aruoma et al., 1989). O efeito indireto é resultante da capacidade do NAC de agir como precursor da glutathiona, aumentando a síntese de GSH. O GSH (glutathiona na forma reduzida) é um antioxidante direto bem conhecido e um substrato de várias enzimas antioxidantes. Há ainda uma atividade de quebra de ligações dissulfeto de proteínas, liberando grupos tiol, que têm uma melhor atividade antioxidante que o NAC, regulando desta forma o estado redox intracelular (Kurutas, 2016; Aldini et al., 2018).

Mao et al (2015) analisaram o efeito do NAC sobre a proliferação e migração de fibroblastos humanos (*normal human skin fibroblasts* - NHFs) quiescentes em um modelo *in vitro* de cicatrização de feridas. Em um ensaio de ferida, as células tratadas com 1 mM e 5 mM de NAC tiveram um aumento significativo na proliferação na área de confecção da ferida, mas exibiram uma diminuição na migração celular. Também exibiram um aumento nos níveis proteicos e de atividade de MnSOD (superóxido dismutase dependente de manganês), que pode estar relacionado com o aumento na proliferação destas células.

Aktunc et al. (2010) investigaram o efeito do uso de NAC na fase proliferativa do processo cicatricial de feridas em camundongos com DM induzido por aloxano. A administração de NAC nas feridas mostrou efeitos benéficos na cicatrização tanto em animais controle como em diabéticos, resultando em redução de EROs e aumento de GSH no tecido cicatricial.

Zayed et al. (2017) demonstraram que o NAC acelera a cicatrização de cotos de amputação de membros em camundongos diabéticos. A perfusão e cicatrização do tecido do coto de amputação foram avaliadas em camundongos adultos C57BL/6J com diabetes induzido por estreptozotocina. Comparados aos controles, os camundongos tratados com NAC demonstraram melhora na cicatrização de coto pós-amputação, na perfusão, na neovascularização do músculo adutor e diminuição dos danos às fibras musculares.

Estes dados sugerem que o uso do NAC como terapia antioxidante no DM pode

ter efeitos benéficos para a cicatrização de feridas, contribuindo para a restauração das funções do fibroblasto no processo cicatricial, bem como para a homeostasia tecidual.

1.7 Fibroblastos e o processo cicatricial

O reparo tecidual é um processo fisiológico que consiste em uma sequência de eventos moleculares e celulares, que ocorrem após o início de uma lesão tecidual, a fim de restaurar o tecido danificado.

Com a lesão tecidual, ocorre o extravasamento de constituintes do sangue, formando o coágulo sanguíneo. A fase inflamatória tem início com a produção de fatores quimiotáticos pelas plaquetas, que por sua vez recruta rapidamente leucócitos para o local da lesão. Esses leucócitos secretam quimiocinas e citocinas inflamatórias para aumentar a resposta inflamatória que normalmente atinge o pico após poucos dias da lesão (Singer & Clark, 1999; Baum & Arpey, 2006).

Após a fase inflamatória, ocorre a formação do tecido de granulação. Este processo tem início na angiogênese e recrutamento dos fibroblastos, através de citocinas dos macrófagos e fatores de crescimento, como TGF- β . A partir deste momento, ocorre a ativação de fibroblastos, a degradação e produção de matriz extracelular (MEC) e neovascularização do tecido, caracterizando a formação do tecido de granulação, que ocorre em torno de 48 horas após a injúria tecidual. A seguir, a reepitelização tem início quando queratinócitos da margem da lesão adquirem motilidade para migrar sobre o local lesado, cobrindo a ferida (Singer & Clark, 1999; Baum & Arpey, 2006).

Na fase proliferativa da cicatrização ocorre a conversão de fibroblastos em miofibroblastos, que proliferam, migram, secretam fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular, necessárias para o fechamento da ferida. Os miofibroblastos também exibem propriedades contráteis, devido à formação de feixes de actina e miosina ou fibras de estresse, desempenhando um papel importante na contração e na maturação do tecido de granulação. A síntese de colágeno cessa no tecido fibrótico, e ocorre a formação de uma cicatriz no local de injúria (Singer & Clark, 1999; Baum & Arpey, 2006; Gurtner et al., 2008).

Durante a fase de remodelação tecidual, os fibroblastos e células inflamatórias

remanescentes secretam enzimas proteolíticas, principalmente as metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores (inibidor tecidual das metaloproteinases, TIMPs). Assim, os componentes sintetizados pelos fibroblastos são modificados à medida que a matriz é remodelada (Schultz & Wysocki, 2009, Bainbridge, 2013).

1.8 Cicatrização de feridas e alterações metabólicas do DM

O processo cicatricial pode ser afetado pelas alterações metabólicas decorrentes da hiperglicemia de diferentes formas. A produção de baixas concentrações de EROs é fundamental para a modulação do processo cicatricial, e para combater microrganismos invasores pelas células do sistema imune, porém a maior produção de EROs afeta todas as fases da cicatrização (Soneja & Malinski, 2005; Wink et al., 2011; Dunnill et al., 2015). A superprodução de EROs pode manter ativos os processos inflamatórios durante mais tempo que o necessário, característica importante na patogênese de feridas crônicas (Khodr & Khalil, 2001; Landén et al., 2016; Cano Sanchez et al., 2018).

Além disso, a hipóxia do tecido decorrente da ruptura vascular e do consumo de O₂ por células do sistema imune estimula a produção de EROs pela mitocôndria, que são capazes de ativar HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*), induzindo a transcrição de genes de sobrevivência importantes para o processo cicatricial. No DM, porém, a circulação microvascular está prejudicada, agravando a oxigenação tecidual. Enquanto a hipóxia temporária, que é um processo fisiológico após a lesão, pode ser benéfica para a cicatrização de feridas, a hipóxia prolongada ou crônica do DM atrasa a cicatrização (Cano Sanchez et al., 2018).

Como citado anteriormente, outro fator importante para as complicações do DM é a produção de AGEs. Os AGEs são um grupo heterogêneo de compostos produzidos pela reação de Maillard, onde um açúcar redutor, como a glicose, reage de forma não enzimática com o grupo amino de proteínas em uma série de reações não reversíveis. A formação de AGEs é um processo fisiológico que ocorre ao longo da vida, e estas moléculas se acumulam lentamente nos tecidos durante o envelhecimento. No entanto, um acúmulo mais rápido e intenso ocorre em associação com hiperglicemia em consequência do aumento do estresse oxidativo (Singh et al., 2014; Cano Sanchez et al., 2018).

Os AGEs são importantes moduladores da cicatrização de feridas, e sua

produção aumentada é prejudicial na cicatrização no DM (Guo & DiPietro, 2010). AGEs podem se formar a partir de moléculas da matriz extracelular, como colágeno, laminina e elastina, causando defeitos na organização das fibras e aumento na rigidez da matriz. Além disso, a ligação de AGEs aos RAGEs causa a ativação de vias de sinalização, como a de NF- κ B, potencializando a transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória (Huijberts et al., 2008; Cano Sanchez et al., 2018).

As alterações metabólicas características do DM também podem prejudicar a função dos fibroblastos e, desta forma, contribuir para a deficiência no processo cicatricial e consequente formação de feridas crônicas. Lerman et al. (2003) mostraram anteriormente que fibroblastos de camundongos diabéticos migram 75% menos que aqueles de camundongos controle, e apresentam uma resposta deficiente à hipóxia. Porém, os mecanismos envolvidos neste efeito ainda não são completamente entendidos.

1.9 Migração celular

Como discutido nas sessões anteriores, o DM prejudica o processo cicatricial de diferentes formas. Os fibroblastos são células fundamentais para a cicatrização, pois secretam fatores de crescimento, proliferam, produzem matriz extracelular, migram e se diferenciam em miofibroblastos, que agem na contração da ferida e remodelamento da matriz neoformada (Schultz & Wysocki, 2009; Singer & Clark, 1999; Baum & Arpey, 2006; Gurtner et al., 2008). Assim, a hiperglicemia pode prejudicar a cicatrização através de alterações no metabolismo dos fibroblastos, e consequente danos às suas funções.

A migração celular depende principalmente da polimerização e despolimerização dinâmica dos filamentos de actina. Esses filamentos se organizam de maneiras diferentes e em domínios subcelulares distintos, formando protrusões da membrana plasmática como lamelipódios e filopódios, que exploram e aderem à matriz extracelular através de adesões. As adesões que se tornam maduras (adesões focais) servem como ancoragem para a formação feixes contráteis de actina e miosina (fibras de estresse), fornecendo a força para tracionar o corpo celular na direção da migração. Simultaneamente, há a liberação de adesões e a retração da parte posterior da célula. Assim, a migração requer uma dinâmica coordenada e bem equilibrada entre as atividades de protrusão e contratilidade. O processo de migração é cíclico e

conduzido por sinais extracelulares, que ativam vias de sinalização reguladoras do citoesqueleto de actina e microtúbulos (Horwitz; Weeb, 2003; Wozniak et al., 2004; Ridley, 2006; Huttenlocher & Horwitz, 2011; Schaks et al., 2019).

Todas as etapas deste processo são conduzidas pela família de GTPases Rho (de *Ras-Homology*). A atividade das GTPases Rho precisa ser ajustada com precisão em locais distintos, para permitir que as células se movam em resposta a diferentes estímulos. Para isso, estas proteínas de baixo peso molecular ciclam entre um estado ativo (ligado a GTP) e um inativo (ligado a GDP). Este ciclo é regulado por GEFs (*Guanine Nucleotide Exchange Factors*) que catalisam a troca de nucleotídeos levando à sua ativação; GAPs (*GTPase Activating Proteins*) que auxiliam na hidrólise do GTP, levando à inativação; e GDIs (*Guanine Nucleotide Exchange Inhibitors*) que removem GTPases inativas das membranas e as mantêm retidas no citoplasma, recobrando sua porção hidrofóbica derivada de isoprenilação pós-traducional. Quando ativas, as GTPases Rho interagem com numerosas proteínas efetoras para exercer suas funções (Ridley, 2001; Etienne-Manneville & Hall, 2003; Raftopoulou & Hall, 2004; Lawson & Ridley, 2018).

As GTPases Rho de maior importância para o processo migratório são RhoA, Rac1 e Cdc42. As GTPases RhoA e Rac1 são ubiquamente expressas e bem conhecidas por seu papel na regulação da migração: Rac1 regula a polimerização de actina no limite anterior da célula para a formação de lamelipódios e a dinâmica da formação de novas adesões, enquanto RhoA está envolvida na formação de feixes contráteis de actina-miosina e maturação de adesões. Já Cdc42 promove a montagem de filamentos de actina para a formação de filopódios na periferia da célula. Desta forma, o balanço entre Rac1 e RhoA tem papel central no controle do comportamento migratório (Ridley, 2001; Raftopoulou & Hall, 2004; Lawson & Ridley, 2018). As GTPases Rho também modulam a dinâmica dos microtúbulos e a polaridade celular.

Para exercer sua atividade, as GTPases Rho ativas interagem com inúmeras proteínas efetoras, desencadeando os processos anteriormente descritos (Bishop & Hall, 2000). Entre os efetores de RhoA e de particular interesse para este estudo, temos ROCKs e as proteínas ERM.

O controle de RhoA na formação dos feixes contráteis de actina e miosina se dá através de seus efetores ROCK 1 e ROCK 2 (*Rho-associated protein kinase*). ROCKs são cinases capazes de fosforilar diferentes substratos. A fosforilação e inibição da fosfatase da cadeia leve de miosina (*myosin light chain – MLC*), e a

fosforilação direta da MLC por ROCK de forma combinada resultam no aumento da fosforilação da MLC, que aumenta a afinidade e favorece a ligação da miosina II com os filamentos de actina, induzindo a formação de fibras de estresse e adesões focais (Totsukawa et al., 2000). Adicionalmente, ROCK inibe a despolimerização dos filamentos de actina indiretamente, resultando no aumento e estabilização dos filamentos de actina. Este efeito ocorre através da fosforilação e ativação da LIM cinase, que por sua vez fosforila a cofilina, inibindo sua atividade de despolimerização da actina (Maekawa et al, 1999; Lee et al., 2019).

O aumento na contratilidade celular desencadeado pela ativação de ROCKs contribui para a formação e maturação de adesões focais, que servem como pontos de ancoragem para promover a protrusão da membrana no limite anterior da célula e contração do corpo celular. Estas adesões transmitem forças geradas no citoesqueleto para a matriz extracelular, e o inverso. A montagem e a maturação de

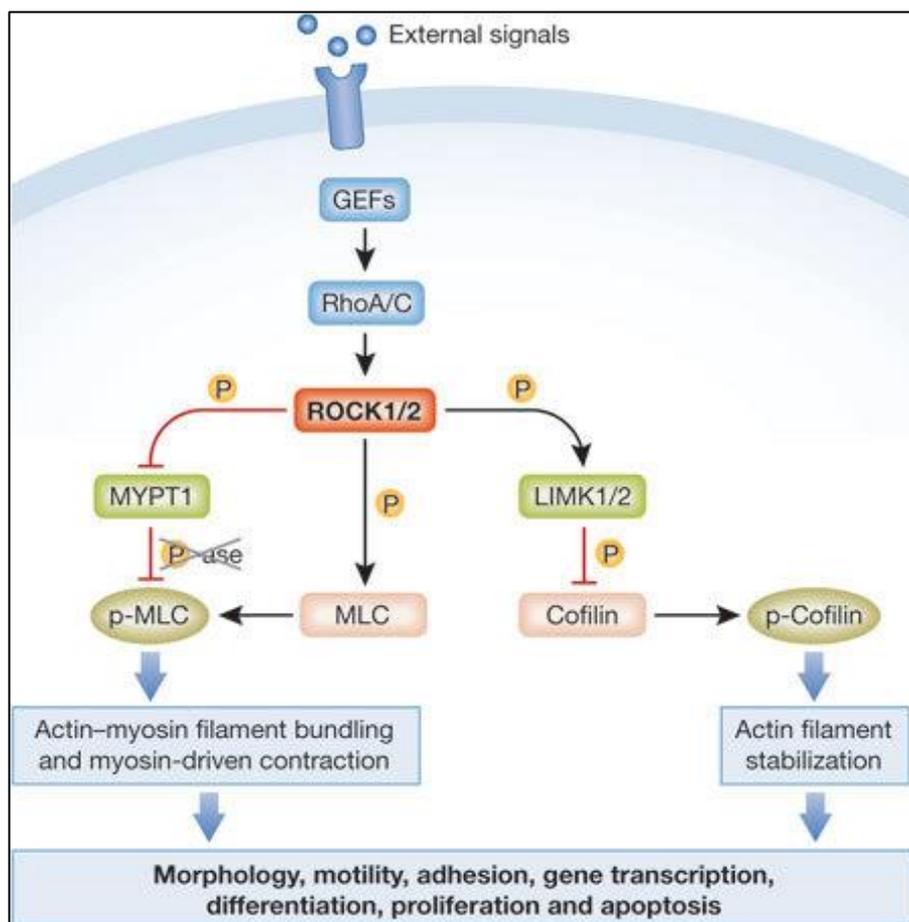


Figura 3. A sinalização RhoA/ROCKs promove a contratilidade celular. Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy. Nicola Rath & Michael F Olson (2012).

adesões são altamente dependentes da presença de força de tração, que causam rearranjos estruturais que, por sua vez, promovem o recrutamento de proteínas adicionais e induzem cascatas de sinalização que levam à maior polimerização da actina (Zaidel-Bar et al., 2004, Amano et al., 2010; Schofield & Bernard, 2013).

A família de proteínas ERM (*Ezrin, Radixin and Moesin*) também são efetores de RhoA, porém suas funções ainda não são completamente conhecidas. Quando fosforiladas, as ERM modulam a plasticidade do córtex celular de actina (Amano et al., 2010). As proteínas ERM podem se ligar de forma direta ou indireta à membrana plasmática e formar pontos de ancoragem de filamentos de actina à membrana. Estão presentes em estruturas de membrana onde estão concentradas as adesões celulares, envolvendo moléculas e mecanismos ainda não totalmente compreendidos (Mangeat et al., 1999).

1.10 Migração celular e glicose elevada

Resultados prévios do nosso grupo (Lamers et al., 2011) mostraram que o estresse oxidativo promovido pela alta concentração de glicose (HG) prejudica a migração e a maturação das adesões em diferentes tipos celulares, incluindo fibroblastos.

A Exposição à HG induz a ativação de Rac1, causando a perda da polaridade celular, e levando à formação de lamelipódios simultaneamente em diferentes direções. Estes lamelipódios retraem com maior frequência, tornando-se protrusões celulares não produtivas, indicando que a maturação das adesões também está prejudicada. Também foi observada a redução da velocidade e direcionalidade celulares. Os efeitos observados sobre a migração e ativação de Rac1 foram revertidos com a adição de NAC 10 mM durante 1 h, indicando que o prejuízo na migração está relacionado diretamente ao dano oxidativo causado pela exposição à glicose elevada.

Em outro estudo do nosso laboratório (Almeida, 2011; Almeida et al., 2016), também foi observada a redução da velocidade de migração de fibroblastos sobre uma matriz de colágeno tipo I. Neste trabalho, os efeitos da glicose elevada (30 mM) durante 3 dias sobre a migração celular foram semelhantes àqueles observados em

fibroblastos dérmicos derivados de ratos diabéticos.

Estes dados indicam a modulação da via das GTPases Rho frente à glicose elevada. A regulação da atividade das GTPases Rho é complexa e pode ocorrer através de interações proteína-proteína, proteína-lipídeos, ligação a segundos mensageiros (DAG) e modificações pós-transcricionais, além de microRNAs, descritos mais recentemente (Huang & He., 2010; Croft & Olson, 2011; Liu et al., 2012; Hodge & Ridley, 2016).

1.11 MicroRNAs

Aproximadamente 90% do genoma de mamíferos é composto de sequências que não codificam proteínas. Destes, 70% dos genes são transcritos, e a partir de técnicas de sequenciamento de RNA, sabe-se atualmente que muitos destes transcritos são RNAs reguladores, entre eles os microRNAs (miRNAs) (Djebali et al., 2012). MiRNAs são uma classe de pequenos RNAs endógenos não-codificantes (~22 nucleotídeos), conservados evolutivamente, que inibem a expressão de genes alvo pareando diretamente com seu mRNA, causando sua degradação ou repressão da tradução.

Os miRNAs estão codificados no genoma na forma de genes individuais com promotor próprio, ou como aglomerados (*clusters*) com número variável de genes, que são transcritos em conjunto em transcrições policistrônicas, e posteriormente processados nos miRNAs maduros individuais. Os miRNAs também podem estar nas regiões de íntrons de genes codificantes de proteínas, bem como de outros tipos de RNAs não codificantes.

Na forma canônica da biogênese de miRNAs, seus genes são transcritos pela RNA polimerase II (Pol II) em sequências capeadas e poliadeniladas chamadas de miRNAs primários (pri-miRNAs). Em uma primeira etapa da biogênese do miRNA, os pri-miRNAs são clivados em estruturas de aproximadamente 70-100 nucleotídeos em formato de "loop", denominados miRNAs precursores (pre-miRNAs) por um complexo de proteínas nucleares formado pela enzima RNase III Drosha, DGCR8 em humanos (*double-stranded RNA (dsRNA)-binding protein (dsRBP) DiGeorge critical region 8*) e outras proteínas auxiliares. Os pré-miRNAs são transportados para o citoplasma através da exportina 5 (Exp5) ligada a RanGTP (O'Brien et al., 2018).

No citoplasma, a enzima RNase III Dicer cliva o pre-miRNA, formando estruturas de dupla fita de 20 a 25 nucleotídeos miRNA:miRNA* (ou extremidades 3p e 5p). Finalmente, ocorre a formação do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, *RNA-Induced Silencing Complex*), onde o miRNA de fita dupla produzido por Dicer é entregue a um membro da família de proteínas Argonauta (AGO), que seleciona uma das fitas do miRNA para se tornar um miRNA maduro, enquanto descarta a outra fita (miRNA*) que pode ser degradada, ou ainda em alguns casos pode ter papel funcional. O complexo RISC funciona através do pareamento com uma sequência complementar em um RNA mensageiro alvo, induzindo sua degradação ou a inibição da sua tradução. A maioria dos miRNAs de animais pareiam imperfeitamente com seus alvos, levando à inibição da tradução (O'Brien et al., 2018).

Este mecanismo leva à redução do nível proteico do alvo do miRNA, e gera profundas consequências na homeostasia celular. Um único gene pode ser regulado por múltiplos miRNAs, assim como um único miRNA pode ter mais que um alvo, devido ao seu pareamento imperfeito com o mRNA (Dong et al., 2003; Gregory & Shiekhatar, 2005; Kim, 2005; Cai et al., 2009; Treiber et al., 2018).

Os miRNAs estão envolvidos em praticamente todos os processos celulares. São essenciais para o desenvolvimento, diferenciação celular, apoptose e movimentação celular. A base de dados *online* miRBase lista atualmente 1.917 miRNAs precursores (pré-miRNAs) e 2.654 miRNAs maduros no *Homo sapiens*, e mais de 60% dos genes codificadores de proteínas humanas são alvos preditos de genes de miRNAs. A desregulação na expressão de miRNAs está associada a inúmeras doenças, como por exemplo o câncer. Os miRNAs podem ser oncogenes (chamados oncomiRs) ou supressores de tumores. Alguns miRNAs são marcadores prognósticos ou alvos potenciais para novas terapias contra o câncer (Esquela-Kerscher & Slack, 2006; Gebert et al, 2018).

Sendo assim, o estudo dos miRNAs é importante para o entendimento tanto de processos fisiológicos quanto de doenças como o câncer, desordens genéticas e desordens metabólicas. A variedade de alvos de um único miRNA pode levar a uma regulação combinatória de miRNAs, que individualmente regulam a expressão de diferentes proteínas de uma única via de sinalização em particular. O funcionamento dos miRNAs é um modo complexo da rede de regulação da expressão gênica.

1.12 MicroRNAs e Diabetes Mellitus

Como dito anteriormente, os miRNAs estão envolvidos em vários processos celulares, e sua desregulação pode estar relacionada a inúmeras condições patológicas. MiRNAs podem estar envolvidos na patogênese do DM, bem como no desenvolvimento das suas complicações, constituindo importantes alvos farmacológicos em potencial para o tratamento desta doença.

Poy et al., (2004) identificaram um miRNA específico de ilhotas pancreáticas, evolutivamente conservado, e que tem papel importante no controle da secreção de insulina: o miR-375. Neste estudo, a superexpressão do miR-375 suprimiu a secreção de insulina induzida pela glicose, e apresentou efeito inverso com a supressão deste miRNA. O mecanismo pelo qual a secreção de insulina é regulada pelo miR-375 parece estar relacionado com um efeito direto na exocitose da insulina. A inibição da miotrofina (Mtpn) (um alvo predito identificado neste estudo) foi estudada com a técnica de RNA de interferência, e apresentou os mesmos efeitos da superexpressão de miR-375 na secreção de insulina e exocitose estimuladas pela glicose. Após este estudo, muitos outros trabalhos abordaram os efeitos de diferentes miRNAs na função das ilhotas pancreáticas e de secreção de insulina, com o objetivo de identificação de novos alvos terapêuticos (Hashimoto & Tanaka, 2016).

Nas fases iniciais do diabetes tipo I, as ilhotas pancreáticas são infiltradas por células imunes, e as células beta ficam expostas a mediadores pró-inflamatórios. A exposição crônica a essas citocinas tem um impacto nas funções das células beta, levando à redução do conteúdo de insulina, defeitos na sua secreção e aumento de apoptose. O perfil global de miRNAs de uma linhagem celular secretora de insulina tratada com citocinas pró-inflamatórias revelou uma forte indução do miR-21, miR-34a e miR-146 (Guay et al., 2010).

O DM também altera os níveis de miRNAs detectáveis no sangue e outros fluidos corporais. Por isso, muitos estudos têm foco em buscar miRNAs que sirvam como biomarcadores, como uma forma de detectar precocemente e prevenir o DM e suas complicações. No T2DM, os níveis de miRNAs alterados no plasma foram detectados em pacientes anos antes da manifestação da doença. Entre estes, destacam-se o miR-15a, miR-28-3p, miR-29b, miR-126 e miR-223 (Zampetaki et al., 2010). Estes miRNAs podem ser usados para prever a susceptibilidade e auxiliar na prevenção da doença.

Sebastiani et al. (2013) analisaram o perfil de miRNAs em amostras de plasma

sanguíneo de pacientes com T2DM, que apresentavam ou não complicações vasculares, em busca de um potencial biomarcador para estas complicações. Entre os miRNAs que se apresentaram alterados no grupo de pacientes com complicações microvasculares, o miR-31 destacou-se por sua expressão elevada, podendo estar relacionado com presença de microangiopatia.

Recentemente, miRNAs estão se tornando ferramentas promissoras para o desenvolvimento de tratamentos para a cicatrização de feridas crônicas (Fahs et al., 2015). O processo de cicatrização envolve um equilíbrio na expressão de miRNAs, que são diferencialmente modulados em fases específicas do processo cicatricial. Desta forma, uma regulação aberrante de miRNAs podem ter um papel chave no estabelecimento de feridas crônicas (Banerjee et al., 2011; Meng et al., 2018; Hiebert & Werner, 2018).

Madhyastha et al. (2012) analisaram quais miRNAs estariam diferencialmente expressos durante a cicatrização normal em camundongos normoglicêmicos, em comparação à cicatrização em camundongos diabéticos. Por meio da análise de um PCR *array* de tecidos cicatriciais depois de 8 dias de cicatrização, foram identificados 14 genes com expressão aumentada na pele de camundongos diabéticos, variando significativamente em comparação a camundongos normais. Estes miRNAs incluem miR-20b, miR-10a, miR-10b, miR-96, miR-128, miR-452 e miR-541. A maioria desses miRNAs participa de processos celulares que influenciam na cicatrização, como proliferação, migração, angiogênese e regeneração tecidual.

Xu et al. (2012) Estudaram o efeito do miR-146 na regulação das respostas imune e inflamatória, na inflamação crônica presente em feridas no DM. Em feridas de camundongos diabéticos, a expressão de MiR-146a foi significativamente reduzida, fato relacionado ao aumento da expressão gênica de seus genes alvo pró-inflamatórios. O aumento da expressão do miR-146a reduziu a expressão gênica de seus genes-alvo pró-inflamatórios, e restabeleceu a cicatrização.

Em um estudo recente, Li et al. (2019) avaliaram o papel do miR-21 produzido por queratinócitos e liberados em vesículas sobre as funções dos fibroblastos. O miR-21 está elevado em queratinócitos após lesão cutânea, coincidindo com a expressão temporal de TGF- β 1, um mediador crítico da cicatrização de feridas. O miR-21 contido nas microvesículas promoveu a migração, diferenciação e contração de fibroblastos, através do controle da expressão de genes associados a ativação da via de sinalização MAPK/ERK.

Como dito, miRNAs podem regular e ser regulados frente a diferentes estímulos, como o estresse oxidativo. A produção de EROs pode induzir a expressão de miRNAs específicos, em diferentes tipos celulares. Porém, pouco se sabe sobre esta forma de regulação (Chen et al., 2013; Magenta et al., 2013; Simone et al., 2009; Kurutas, 2016).

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

Neste outro estudo recente, Kao et al. (2019) mostram que o miR-31 potencialmente aumenta o estresse oxidativo intracelular, através de seu alvo Sirt3 em carcinoma oral. *Silent information regulator 3* (Sirtuin3 ou SIRT3) é uma enzima desacetilase de histonas, portanto, com função supressora na transcrição gênica. Sirtuinas são dependentes de NAD⁺, desta maneira, funcionam como sensores metabólicos, relacionando sinais ambientais e resposta ao estresse. A inibição de Sirt3 por miR-31 prejudicou o potencial de membrana mitocondrial e a sua integridade estrutural em células de carcinoma oral, contribuindo para a gênese do estresse oxidativo. Além disso, o miR-31 foi capaz de alterar o metabolismo das células tumorais, favorecendo o metabolismo glicolítico ao invés do metabolismo aeróbico.

1.13 MicroRNAs e migração celular

A migração celular também pode ser regulada por miRNAs, através do silenciamento de proteínas alvo que façam parte da via de GTPases Rho, assim como integrinas e outras moléculas de adesão ou componentes da matriz extracelular (He et al., 2012; Liu et al., 2012; Cherfils & Zeghouf, 2013; Ibrahim et al, 2014). Desta forma, condições patológicas que levem à alteração na expressão de diferentes miRNAs em conjunto, pode alterar o funcionamento desta via de sinalização, e consequentemente a regulação do citoesqueleto.

Em câncer de mama, o miR-31 inibe diretamente a expressão das subunidades de integrinas como $\alpha 5$, $\alpha 2$, αv e $\beta 3$, que formam receptores para fibronectina e colágeno, reduzindo desta forma sua quantidade na superfície celular (Augoff et al., 2011). Também em câncer de mama, o miR-31 tem como alvo Wave3, um efetor importante de GTPases Rho, que atua na polimerização ramificada de actina para a formação de lamelipódios através da ativação do complexo Arp2/3 (Sossey – Alaoui et al., 2010).

Estes dados mostram que o miR-31 tem papel importante na modulação do citoesqueleto e na migração em diferentes tipos celulares e em diferentes contextos. Neste estudo avaliamos o efeito da superexpressão do miR-31 causado pelo estresse oxidativo resultante da hiperglicemia, e seu papel na regulação da capacidade migratória de fibroblastos.

1.14 MiR-31, estresse oxidativo e migração celular – resumo dos resultados anteriores

Dados anteriores deste projeto (Cibele C. Gomes, dissertação de mestrado) mostraram que a exposição de fibroblastos NIH-3T3 a alta concentração de glicose prejudica a migração celular de maneira dependente do estresse oxidativo, e que este efeito está relacionado com a superexpressão de miR-31-5p nestas células.

Neste estudo, células NIH-3T3 foram expostas a uma concentração elevada de glicose durante 3 dias, e a migração celular e formação de protrusões de membrana foram analisadas. As células mantidas em HG apresentaram um aumento na formação de protrusões de membrana simultâneas e que retraíram com maior frequência, quando comparada ao grupo controle mantido em concentração fisiológica de glicose. Além da formação de protrusões, foi observado ainda a perda da velocidade e de direcionalidade de migração. Estes efeitos foram prevenidos em presença do antioxidante n-acetilcisteína, indicando que o estresse oxidativo gerado pelo elevado metabolismo da glicose nestas células pode ter relação direta com os a diminuição na sua capacidade migratória.

Conforme dito anteriormente, as GTPases Rho e seus efetores são os principais reguladores da migração celular. O miR-31, por sua vez, tem como potenciais alvos alguns efetores da família das GTPases Rho, e está relacionado ao estresse oxidativo.

Por este motivo, avaliamos a expressão de miR-31 em células NIH-3T3 em HG, visando estabelecer uma possível relação entre sua expressão e os efeitos observados na migração celular. Também foram avaliados os possíveis alvos de miR-31 através da análise de bancos de dados de bioinformática.

De fato, observamos que o miR-31 está superexpresso em HG quando comparado com LG, bem como em cultura primária de fibroblastos dérmicos de animais diabéticos, quando comparados ao grupo de animais controle. Em células NIH-3T3 foi avaliado também o papel do antioxidante N-acetilcisteína, e observamos que este miRNA é potencialmente regulado pelo estresse oxidativo, pois sua expressão em células HG se manteve em nível semelhante ao do grupo controle, quando estas foram tratadas com o antioxidante.

Para avaliar o efeito direto do miR-31 sobre a migração celular, células NIH-3T3 foram transfectadas com a sequência exógena do miR-31 com o objetivo de superexpressar este miRNA, e os parâmetros migratórios e de formação de protrusões foram novamente avaliados. Observamos que estas células apresentaram maior formação de protrusões não produtivas e simultâneas, e a perda de direcionalidade, de forma semelhante ao observado nos fibroblastos expostos a glicose elevada. Porém, não houve efeito significativo na velocidade de migração. Estes dados mostram que a superexpressão do miR-31 induzida pela exposição à glicose elevada é prejudicial para a migração de fibroblastos, e que seu efeito se dá principalmente na regulação da estabilidade de protrusões formadas, sugerindo que sua função esteja relacionada à formação e maturação de adesões, bem como à contratilidade celular.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo elucidar os mecanismos pelos quais o miR-31, que tem sua expressão aumentada em fibroblastos expostos a uma concentração elevada de glicose, modula negativamente a migração celular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de linhagem de fibroblastos – NIH-3T3

A linhagem celular NIH-3T3 (fibroblastos embrionários murinos) foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC®, Virgínia, Estados Unidos). As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml (Invitrogen, Grand Island, NY), 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA - glicina, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-ácido glutâmico, L-prolina, L-serina (Invitrogen, Grand Island, NY) e mantidas em estufa umidificada com 8% de CO₂/ 92% ar à 37 °C. As passagens foram feitas a cada 3 dias.

Para execução dos experimentos, as células foram semeadas e mantidas em condições de cultura por 3 dias em meio apropriado, de acordo com os grupos experimentais abaixo:

1. Controle (*Low glucose* - **LG**) – concentração fisiológica de glicose: meio DMEM LG (com 5 mM D-glicose) com SFB 10%, antibióticos e NEAA.
2. Alta concentração de glicose (*High glucose* - **HG**): meio DMEM LG (5 mM D-glicose) + 25 mM D-glicose, resultando em concentração final 30 mM (Sigma-Aldrich®), SFB 10%, antibióticos e NEAA.

3.2 Cultura de linhagem de fibroblastos NIH-3T3 em presença do antioxidante N-acetilcisteína (NAC)

Células NIH-3T3 foram cultivadas em presença do antioxidante N-acetilcisteína (NAC, Sigma-Aldrich®) durante 3 dias. Este foi adicionado aos meios de cultura na concentração final de 5 mM. Inicialmente, o NAC foi diluído em água ultrapura na concentração de 0,5 M, o pH foi ajustado para 7,4 e a solução foi filtrada. A diluição

desta solução na concentração já citada foi feita no momento do uso em meio de cultura.

3.3 Ensaios funcionais in vitro após superexpressão e supressão do miR-31-5p

3.3.1 Superexpressão do miR-31 em células NIH-3T3

A superexpressão do miR-31-5p em células NIH-3T3 cultivadas em meio de cultura contendo concentração fisiológica de glicose (5mM D-glicose) foi realizada por transfecção transiente utilizando miRNA-31 sintético (kit mirVana™ miRNA Mimic para o miR-31-5p, ID 10653, Thermo Fisher Scientific), conforme instruções do fabricante. As células foram transfectadas utilizando *Lipofectamine 2000* (Thermo Fisher Scientific). Quatro grupos experimentais foram determinados para a superexpressão, sendo três controles:

1. **NIH-3T3:** células em meio DMEM LG com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 µg/ml e NEAA 1%.
2. **Mock:** células em meio DMEM LG com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 µg/ml e 1% NEAA + meio OPTMEM + Lipofectamina.
3. **miRNA Controle Negativo:** células em meio DMEM LG com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 µg/ml e NEAA 1% + meio OPTMEM + Lipofectamina + mimic miRNA controle negativo (50 nM).
4. **Mimic miR-31-5p:** células em meio DMEM LG com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 µg/ml e NEAA 1% + meio OPTMEM + Lipofectamina + mimic miR-31-5p (50 nM).

Células (1×10^5) foram semeadas em meio de cultura DMEM LG com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 µg/ml e NEAA 1% e, após 24 horas, as transfecções foram realizadas conforme as condições descritas acima. Ao final de 5 horas, os meios de transfecção foram substituídos por meio de cultura DMEM LG com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 µg/ml e NEAA 1% (Tempo 0 h). Os plaqueamentos para os experimentos de vídeo microscopia (*time-lapse*) para análise de protrusões de membrana, coloração de F-actina, coleta de proteínas e coleta de RNA (para verificação da expressão de miR-31) foram realizados após 24 horas de

transfecção; os experimentos foram finalizados após 48 h da transfecção (completando 3 dias) e após 60 h para as análises de velocidade e direcionalidade de migração; foram coletadas novas amostras de RNA ao final desses experimentos.

3.3.2 Supressão com anti-miR-31 em células NIH-3T3

A supressão do miR-31-5p em células NIH-3T3 cultivadas em meio LG ou HG foi realizada por transfecção transiente utilizando o inibidor sintético do miR-31-5p (kit mirVana™ miRNA Inhibitor para o miR-31-5p, ID AM10653, Thermo Fisher Scientific), conforme instruções do fabricante. As células foram transfectadas utilizando-se *Lipofectamine 2000* (Thermo Fisher Scientific). Seis grupos experimentais foram determinados, sendo 3 grupos em cultivados em meio LG e 3 grupos cultivados em meio HG, conforme descrito abaixo:

1. **NIH-3T3 LG:** células em meio DMEM LG (5 mM D-glicose) com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 µg/ml e NEAA 1%.
2. **miRNA Controle Negativo (LG Neg):** células em meio DMEM LG com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 µg/ml e NEAA 1% + meio OPTMEM + Lipofectamina + mimic miRNA controle negativo (50 nM).
3. **Anti-miR-31-5p LG:** células em meio DMEM LG com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 µg/ml e NEAA 1% + meio OPTMEM + Lipofectamina + anti-miR-31-5p (50 nM).
4. **NIH-3T3 HG:** células em meio DMEM HG (30 mM D-glicose) com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 µg/ml e NEAA 1%.
5. **miRNA Controle Negativo (HG Neg):** células em meio DMEM HG com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 µg/ml e NEAA 1% + meio OPTMEM + Lipofectamina + mimic miRNA controle negativo (50 nM).
6. **Anti-miR-31-5p HG:** células em DMEM HG com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 µg/ml e NEAA 1% + meio OPTMEM + Lipofectamina + anti-miR-31-5p (50 nM).

Células (1×10^5) foram plaqueadas em meio de cultura DMEM LG ou HG, com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 $\mu\text{g/ml}$ e NEAA 1% e, após 24 horas, as transfecções foram realizadas conforme as condições descritas acima. Ao final de 5 horas, os meios de transfecção foram substituídos por meio de cultura DMEM LG ou HG com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 $\mu\text{g/ml}$ e NEAA 1% (Tempo 0 h). Os plaqueamentos para os experimentos de vídeo microscopia (*time-lapse*) para análise de protrusões de membrana, coloração de F-actina, coleta de proteínas e coleta de RNA (para verificação da expressão de miR-31) foram realizados após 24 horas de transfecção; os experimentos foram finalizados após 48 h da transfecção (completando 3 dias) e após 60 h para as análises de velocidade e direcionalidade de migração; foram coletadas novas amostras de RNA ao final desses experimentos.

3.4 Extração de RNA total e análise da expressão de miR-31-5p por RT-PCR

Para avaliar a expressão gênica do miR-31-5p, células (1×10^5) foram semeadas em placas de cultura nas diferentes condições experimentais previamente descritas e, após 24 horas, foi realizada a coleta do RNA total (completando 3 dias de exposição para os experimentos onde houve exposição a HG e NAC).

A extração do RNA total foi realizada pelo método do Trizol (Thermo Fisher Scientific) conforme instruções do fabricante. A síntese do cDNA do miR-31-5p e do snoRNA, utilizado como gene de referência, foi realizada a partir do kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* (Life Technologies) e a expressão por RT-PCR, com o kit *miRNA Taqman® MiRNA Assays*, específicos para ambos (miR-31-5p, ID 00185 e snoRNA ID 001718 Thermo Fisher Scientific). Para a quantificação do miR-31-5p foi utilizado o kit Taqman Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Thermo Fisher Scientific) e primers específicos para o miR e gene de referência, conforme instruções do fabricante. As reações foram realizadas em termociclador ABI 7300 *Sequence Detection System®* e os resultados foram analisados utilizando o programa de análise *qGENE Software for QTL data exploration*. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.5 Ensaios de vídeo microscopia (*time-lapse*) para avaliação da migração celular

Células NIH-3T3 foram semeadas em placas de 12 poços (3×10^3 células por poço), previamente recobertas com fibronectina ($1 \mu\text{g/ml}$) e mantidas em condições de cultura. Após 24 horas, os movimentos celulares foram monitorados utilizando o sistema de microscopia *In Cell Analyzer 2200 (GE®)* (CEFAP-USP) com controle de temperatura e pH. Imagens foram obtidas inicialmente em intervalos de 42 segundos durante 30 minutos para análises de protrusões celulares e, posteriormente, em intervalos de 20 minutos por pelo menos 12 horas, para avaliar direcionalidade e velocidade celulares. As imagens foram organizadas em séries utilizando o programa Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) e convertidas em filmes. A trajetória individual de cada célula foi acompanhada por um período mínimo de 12 horas, sendo excluídas da análise as células que sofreram divisão celular. As coordenadas X-Y e a velocidade das células foram utilizadas para análise.

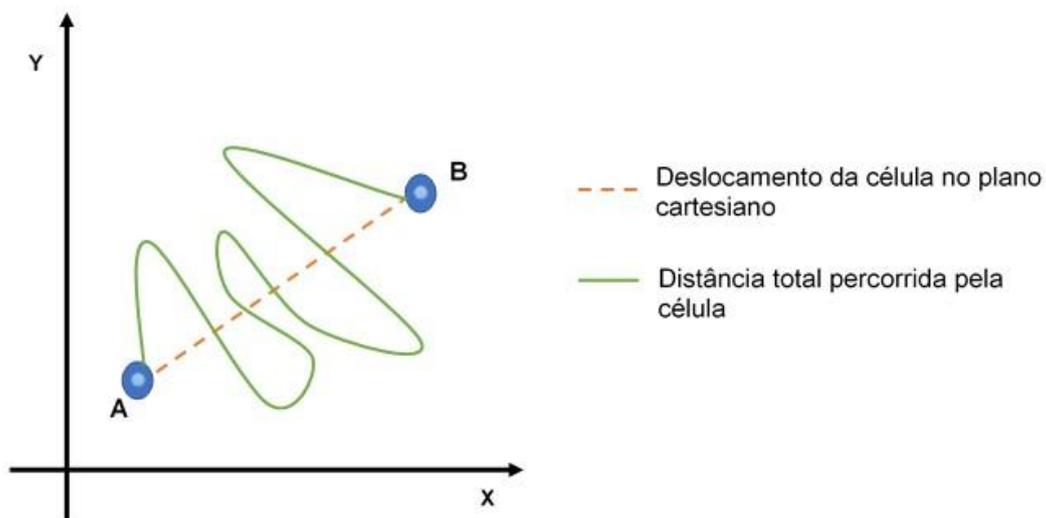


Figura 4. Análise da direcionalidade de migração celular. Uma célula tem sua trajetória acompanhada durante um vídeo obtido por *time-lapse*, utilizando-se o programa Image J. Desta forma, é possível obter as coordenadas X e Y do deslocamento desta célula no plano cartesiano (linha pontilhada, D), enquanto a distância total percorrida pela célula (T) representa o deslocamento real entre os pontos A e B. A velocidade é deslocamento/tempo, e é fornecida pelo programa.

Para o cálculo do índice de direcionalidade (razão D/T), foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Direcionalidade} = \frac{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}{\text{Distância}}$$

Onde:

- $\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}$: resultante da soma vetorial do deslocamento da célula no plano cartesiano (D);
- Distância: distância total percorrida pela célula (T).

3.6 Caracterização do citoesqueleto de F-actina

Células NIH-3T3 (4×10^3) foram semeadas sobre lamínulas de vidro (18 mm de diâmetro) previamente recobertas por fibronectina (1 $\mu\text{g/ml}$) em placas de 12 poços por 24 horas. As células foram então pré-fixadas e permeabilizadas com paraformaldeído (PFA) 4% em tampão PHEM (Pipes 60 mM, Hepes 2 mM, EGTA 10 mM, MgCl_2 2 mM, pH 6,9) contendo Triton X-100 0,5% e sacarose 5% por 5 minutos. Após fixação por 30 minutos com PFA 4% em tampão PHEM contendo sacarose 5% e sucessivas lavagens com tampão PHEM + glicina 100 mM, as células foram coradas com faloidina-alexa fluor 488 (Molecular Probes®, 1:750) por 2 horas à temperatura ambiente (TA) e o núcleo corado com DAPI durante montagem (Vectashield +DAPI). As imagens foram obtidas por microscopia confocal (Microscópio confocal de óptica não linear Zeiss LSM 780-NLO, Carl Zeiss®, Germany) do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP – USP).

3.7 Análise *in silico* de potenciais alvos preditos do miR-31-5p por Bioinformática

Os programas on-line miRBASE (*Welcome Trust Sanger Institute*, <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>), TargetScan (*Whitehead Institute for*

Biomedical Research, www.targetscan.org) e o PICTAR (<http://pictar.bio.nyu.edu/>) foram utilizados para realizar análises *in silico* dos alvos preditos de miR-31-5p.

3.8 Análise de expressão proteica por *Western Blotting*

Células NIH-3T3 (3×10^5) foram lavadas com PBS e homogeneizadas em tampão Tris 0,025 M (pH 7.5) na presença de inibidores de proteases, em gelo. A seguir as amostras foram incubadas por 20 minutos a 4°C e centrifugadas a 14000 rpm a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, a concentração proteica no sobrenadante das amostras foi determinada pelo método de Bradford. As amostras (20 µg de proteína) foram aplicadas em um gel de poliacrilamida, submetidas à migração eletroforética (10 a 15%, SDS-PAGE) em TA e, posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad - USA). O bloqueio de sítios inespecíficos foi feito com leite desnatado 5% de leite em pó desnatado diluído em tampão TBS-T (Tris Base 1 M, NaCl 3 M e Tween 20 0,05%) por 1h à TA sob agitação. Após 3 lavagens de 15 minutos com TBS-T, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários durante 2 horas à TA (anti-ROCK 1 Abcam rabbit MAb #ab45171, 1:2000; anti-ROCK 2 Millipore rabbit clone A9W4 #04-841, 1:500; anti-Radixin Cell Signaling rabbit MAb clone C4G7 #2636, 1:1000, anti-integrin α Abcam rabbit polyclonal #ab76609, 1:500 e anti- β actin Sigma-Aldrich mouse MAb clone AC-74 #A228, 1:7500), lavadas em TBS-T por 15 minutos e subsequentemente incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1 hora à TA (goat anti rabbit-HRP Bio-rad #1705046, 1:5000; goat-anti-mouse HRP Bio-rad 1:7500). Os resultados foram obtidos por quimioluminescência (Clarity® Western ECL Substrate – Bio-rad) e a quantificação das bandas foi determinada por densitometria, utilizando o programa Image J (NIH). Os valores obtidos foram normalizados pelos valores da densitometria do controle interno β - actina.

3.9 Construção de plasmídeo repórter contendo o sítio de ligação do miR-31 e ensaio de luciferase

Os plasmídeos pmiRGlo-ROCK1-WT, pmiRGlo-ROCK 1-MUT (Figura 5A), pmiRGlo-RDX-WT e pmiRGlo-RDX-MUT (Figura 5B) foram construídos de acordo com as instruções do fabricante (pmirGLO *Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector* - Promega, Madison, WI, USA). Inicialmente, os sítios preditos de ligação do miR-31-5p à região 3' UTR ROCK 1 e 3'UTR-RDX foram obtidos nas bases de dados de bioinformática e desenhados contendo um sítio interno de restrição para a enzima NotI e dois sítios adicionais de restrição para as enzimas XbaI e XhoI na região 5' e 3', respectivamente. Versões mutadas foram construídas de maneira similar (Figura 5). A clonagem de cada segmento foi realizada no plasmídeo pmiRGlo na região a jusante do gene da luciferase (*luc2*) através do anelamento de dois primers (WT/miR-31 Forward e Reverse), que contém a sequência para enzimas XbaI e XhoI. A orientação da inserção dos oligonucleotídeos foi verificada através da digestão do plasmídeo com a enzima NotI (sítio presente somente no plasmídeo com oligonucleotídeos inseridos na posição correta).

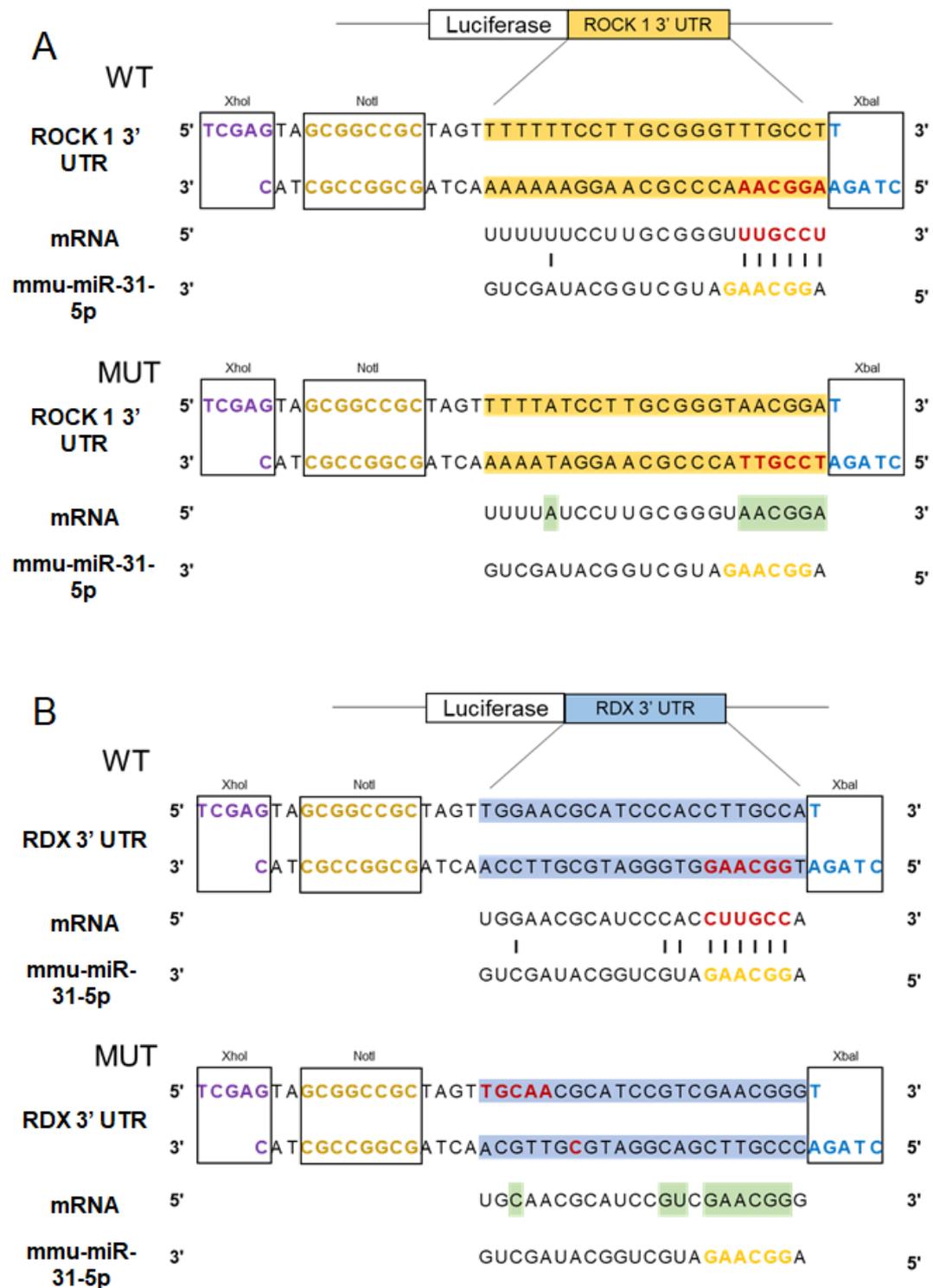


Figura 5. Construção dos plasmídeos de Radixina e ROCK 1 para validação de alvos do miR-31. Os plasmídeos pmIRGLO foram construídos a partir da região de pareamento do mRNA de ROCK 1 (A) e RDX (B) com o miR-31, previstas por análise bioinformática. Nos plasmídeos mutados, os nucleotídeos da *seed sequence* foram substituídos por nucleotídeos semelhantes aos presentes na sequência do miRNA, impedindo sua interação. Em realce amarelo, o trecho da sequência de 3' UTR de ROCK 1; em realce azul, o trecho da sequência de 3' UTR de RDX; em letras amarelas, a *seed sequence* do mmu-miR-31-5p; em letras vermelhas, a região de pareamento com a *seed sequence* presente no mRNA; em realce verde, os nucleotídeos mutados para impedir a interação do mRNA com o miR-31.

A validação dos alvos ROCK 1 e RDX foi realizada por meio da co-transfecção transiente dos plasmídeos pmiRGlo-WT ou pmiR-Glo-MUT respectivos, na presença de mimic-miR-31 (50 nM) em células NIH-3T3, utilizando *Lipofectamine 2000* (Thermo Fisher Scientific). Ao final de 5 horas, os meios de transfecção foram substituídos por meio de cultura DMEM LG com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 µg/ml e NEAA 1% (Tempo 0 h). Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS e incubadas com *passive lysis buffer* (PLB do kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* - Promega), sob agitação por 20 minutos. O lisado foi coletado e a atividade de luciferase (luminescência) foi medida em aparelho luminômetro *Synergy® HTX Multi-Mode Microplate Reader* (Biotek, USA) com o kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Os valores foram normalizados pelo nível de luminescência da renilla, codificada no plasmídeo pmiRGlo através de um promotor independente.

3.10 Transfecção com plasmídeo paxillin-eGFP e análise de adesões por microscopia TIRF

Células NIH-3T3 (2×10^4) foram semeadas em placas de 35 mm de diâmetro com fundo de vidro (MatTek Corporation, EUA) em meio DMEM LG ou HG com SFB 10%, penicilina 20 U/ml, estreptomicina 20 µg/ml e NEAA 1% e, após 24 horas, a transfecção transiente com o plasmídeo Paxillin-pEGFP (#15233, Addgene) foi realizada utilizando-se *Lipofectamine 2000* (Thermo Fisher Scientific), conforme instruções do fabricante. Para os experimentos de co-transfecção, o mimic-miR-31 (50 nM) ou anti-miR-31 (50 nM) foram adicionados na mesma solução, juntamente com o plasmídeo Paxillin-pEGFP (500 ng/ml). Ao final de 5 horas, os meios de transfecção foram substituídos por DMEM LG ou HG. Após 24 horas, os movimentos celulares foram monitorados utilizando o sistema de microscopia de fluorescência de reflexão interna total (TIRFM), com microscópio AxioVert.Z1 (Carl Zeiss Microscopy®) com objetivas α Plan-Apochromat 63x óleo, Laser *Solid State Laser* 488nm, 30mW (cat. 400600-9040-000) e câmera AxioCam MRm (Carl Zeiss Microscopy®) com controle de temperatura e pH (*time-lapse*). Esse sistema explora as propriedades de uma onda

evanescente induzida na região imediatamente adjacente à interface entre dois meios (área de contato entre uma célula e a lamínula de vidro) com diferentes índices de refração. Imagens de vídeo foram coletadas em intervalos de 10 segundos durante 30 minutos para adesões focais. Os vídeos foram analisados utilizando o programa Image J (NIH, Bethesda, MD, USA), com o plugin *Advanced Weka Segmentation*. A partir dos dados obtidos, foi analisado o número de adesões por célula, bem como a circularidade e a área de cada adesão.

3.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism (versão 5.0). Os resultados foram submetidos ao teste t de Student para análises de apenas duas populações de dados e ANOVA com pós-teste de Tukey para mais de duas populações. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com $p < 0,05$.

RESULTADOS

4.1 A concentração elevada de glicose reduz a expressão proteica de ROCK 1 e RDX em células NIH-3T3, sem alterar a expressão de ROCK 2 e da subunidade $\alpha 5$ de integrina

Para avaliar como a exposição à glicose elevada (HG), na presença ou ausência de um agente antioxidante (NAC), afeta a expressão proteica de alvos preditos do miR-31 relacionados à migração celular, células foram expostas à HG por 3 dias e a expressão de *Rho kinase 1* (ROCK 1), *Rho kinase 2* (ROCK 2), Radixina (RDX) e da integrina $\alpha 5$ foi avaliada por *Western Blotting*. A exposição de células à HG reduziu a expressão de ROCK 1 em 20% e de RDX em 23% em relação ao grupo controle com concentração fisiológica de glicose (LG) e, em presença do NAC, a expressão destas proteínas foi mantida em 100% e 95%, respectivamente (Figura 6A, 6C). ROCK 2, entretanto, não apresentou redução significativa na expressão proteica em HG; o tratamento com NAC também não alterou a expressão de ROCK 2 (Figura 6B). De maneira geral, o tratamento com NAC não teve efeito em células controle, exceto com relação à expressão de RDX, que foi reduzida em aproximadamente 20% (Figura 6C).

Também foi avaliada a expressão da integrina $\alpha 5$ que, em estudos anteriores, teve sua expressão reduzida em fibroblastos dérmicos de ratos diabéticos (Almeida et al., 2016). No entanto, em células NIH-3T3 expostas à HG por 3 dias, este mesmo efeito não foi observado. É possível que o efeito da glicose elevada sobre a expressão de integrina $\alpha 5$ esteja relacionado ao tipo de fibroblasto, considerando-se a variação fenotípica existente nessa população celular (Figura 6D).

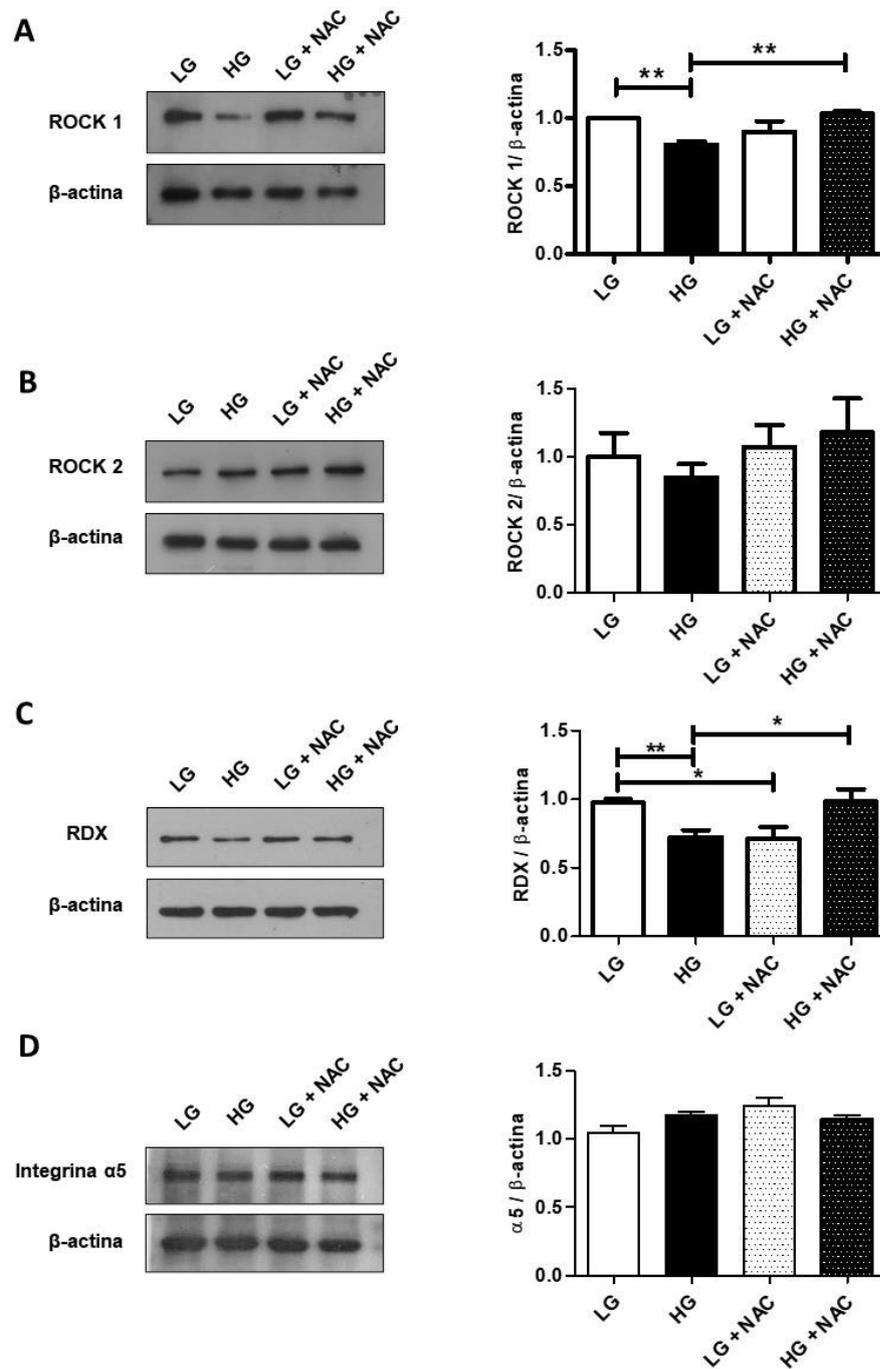


Figura 6. A elevada concentração de glicose reduz a expressão proteica de ROCK 1 e RDX, sem alterar a expressão de ROCK 2 e Integrina α 5 em células NIH-3T3. As células foram expostas a uma concentração de glicose fisiológica (5 mM) ou elevada (30 mM), na presença ou não do antioxidante N-acetil cisteína (NAC) durante 3 dias. A expressão proteica de (A) ROCK 1; (B) ROCK 2; (C) RDX e (D) Integrina α 5 foi analisada por *Western Blotting* e a densitometria das bandas foi realizada utilizando-se o programa FIJI – ImageJ (NIH). Resultado obtido de quatro experimentos independentes, apresentado como média \pm erro padrão da média (EPM). LG: célula em meio de cultura com glicose 5 mM; HG: célula em meio de cultura com glicose 30 mM; LG + NAC: células em meio de cultura LG com NAC 5 mM; HG + NAC: células mantidas em meio de cultura HG em presença de NAC 5 mM. Diferenças estatisticamente significantes: * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

4.2 A superexpressão de miR-31 reduz a expressão proteica de ROCK 1, ROCK 2 e RDX e não altera a expressão de integrina $\alpha 5$

Com o objetivo de investigar se ROCK 1, ROCK 2, RDX e a integrina $\alpha 5$ são potenciais alvos de miR-31, células NIH-3T3 mantidas em meio com 5 mM de glicose (LG) foram transfectadas com sequências sintéticas do miR-31-5p (mimic). Em seguida, amostras de proteína foram coletadas e submetidas à análise por *Western Blotting*.

A eficiência da transfecção foi confirmada por PCR em tempo real, com aumento médio de 25 vezes (miR-31) em relação a todos os controles do experimento (NIH-3T3, Mock e Neg) (Figura 7).

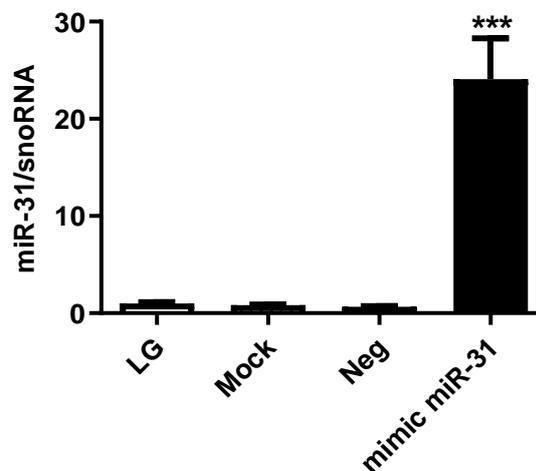


Figura 7. Superexpressão de miR-31-5p em linhagem NIH-3T3. Células NIH-3T3 foram transfectadas com sequências sintéticas de miR-31-5p (mimic), conforme descrito em Métodos. A expressão do miR-31 foi avaliada por PCR em tempo real. Resultado obtido de quatro experimentos independentes. NIH-3T3: células em meio de cultura LG; Mock: células expostas aos reagentes da transfecção; Neg: células transfectadas com mimic miRNA controle negativo; miR-31-5p: células transfectadas com mimic miR-31-5p. Diferenças estatisticamente significantes: *** $P > 0,0001$ (NIH-3T3, Mock, Neg vs. miR-31).

A superexpressão de miR-31-5p reduziu a expressão proteica de ROCK 1 em aproximadamente 35%, de ROCK 2 em 35%, e de RDX em 45%, quando comparados aos grupos controles (Figura 8A, 8B, 8C). Este resultado sugere que ROCK 1, ROCK

2 e RDX sejam alvos potenciais do miR-31 em células NIH-3T3. A expressão de integrina $\alpha 5$, por outro lado, não apresentou redução com a superexpressão de miR-31 (Figura 8D), reduzindo a possibilidade de que a cadeia $\alpha 5$ possa ser alvo do miR-31.

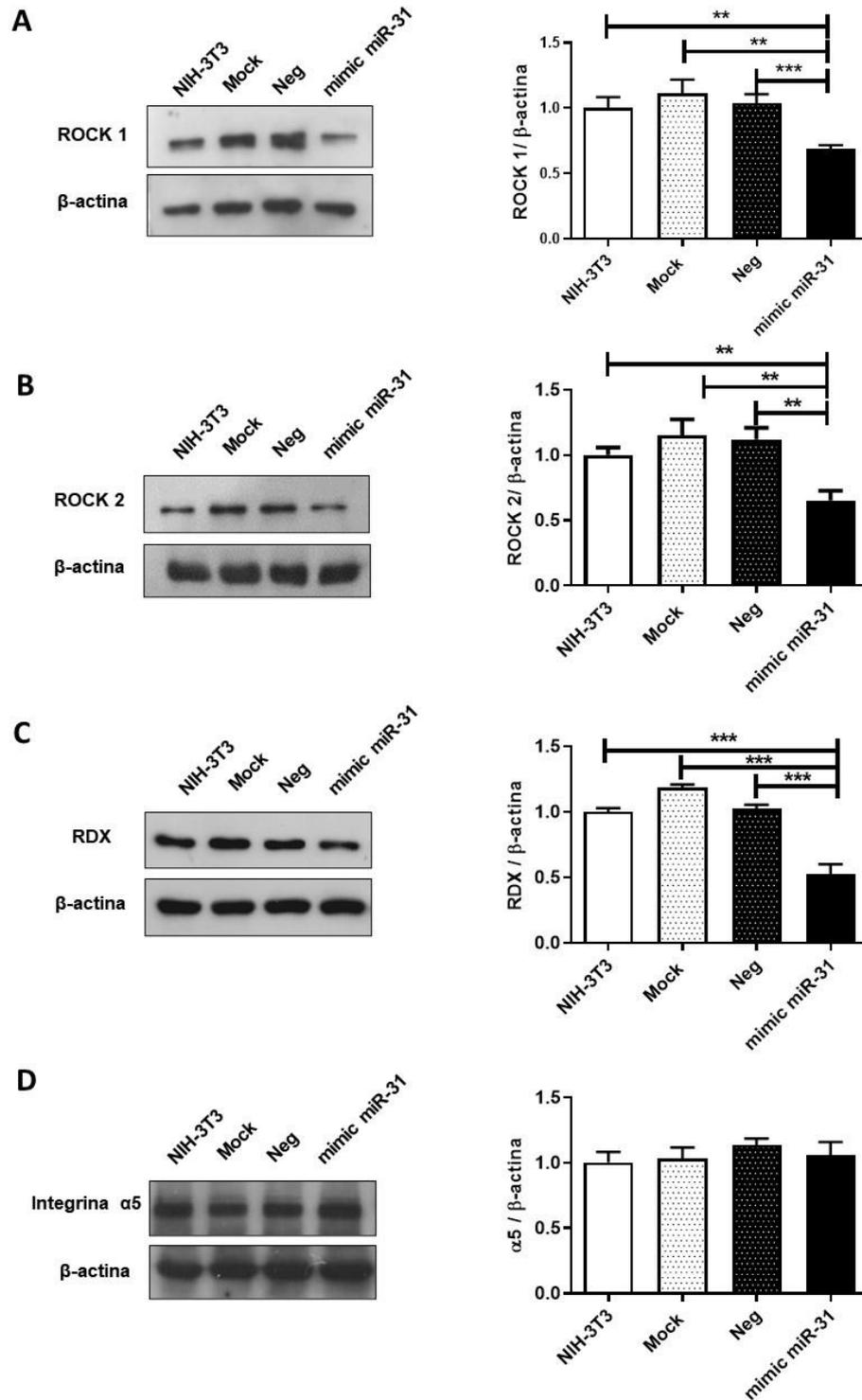


Figura 8. A superexpressão de miR-31-5p em células NIH-3T3 reduz a expressão proteica de ROCK 1, ROCK 2 e RDX, mas não altera a expressão de integrina $\alpha 5$. Células NIH-3T3 mantidas em LG foram transfectadas com sequências sintéticas de miR-31-5p (mimic), conforme descrito em Métodos. A expressão proteica de (A) ROCK 1, (B) ROCK 2, (C) RDX e (D) Integrina $\alpha 5$ foi analisada por *Western Blotting*, e a densitometria das bandas foi feita utilizando o programa FIJI - ImageJ. Resultado obtido de quatro experimentos independentes. NIH-3T3: células em meio de cultura LG; Mock: células expostas aos reagentes da transfecção; Neg: células transfectadas com mimic miRNA controle negativo; miR-31-5p: células transfectadas com mimic miR-31-5p. Diferenças estatisticamente significantes: **P> 0,01; ***P> 0,0001 (NIH-3T3, Mock, Neg vs. miR-31).

4.3 Supressão de miR-31

Conforme mencionado na introdução, observamos previamente que a superexpressão do miR-31-5p em células NIH-3T3 apresentou efeitos na migração celular similares àqueles observados após exposição à glicose elevada (Gomes, 2015). Com o objetivo de investigar como a supressão de miR-31 poderia influenciar no fenótipo migratório, assim como sua capacidade de reverter os efeitos da exposição à glicose elevada sobre este parâmetro, células NIH-3T3 mantidas em meio LG ou HG foram transfectadas com anti-miR-31 para avaliação da migração celular, análise da organização do citoesqueleto de actina e expressão proteica de alvos potenciais (ROCK 1, ROCK 2 e RDX).

Inicialmente, a eficiência da transfecção foi confirmada por PCR em tempo real. Conforme já havíamos observado previamente, a exposição das células à glicose elevada aumentou a expressão de miR-31 em 45-50% (Figura 9). A transfecção com anti-miR-31 inibiu em 95% a 97% a expressão desse miRNA, em comparação aos grupos controle (Figura 9).

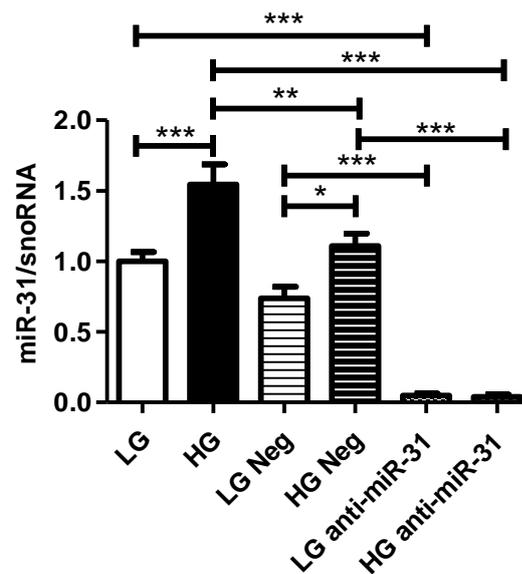


Figura 9. Supressão de miR-31-5p em linhagem NIH-3T3. Células NIH-3T3 foram transfectadas com sequências sintéticas inibidoras do miR-31-5p (anti-miR-31), conforme descrito em Métodos. A expressão do miR-31 foi avaliada por PCR em tempo real. Resultado obtido de quatro experimentos independentes. LG: células mantidas em meio de cultura LG; HG: células mantidas em meio de cultura HG; LG Neg: células mantidas em meio LG transfectadas com controle negativo para anti-miR; HG NEG: células mantidas em meio de cultura HG transfectadas com controle negativo anti-miR; LG anti-miR-31: células mantidas em meio de cultura LG, transfectadas com anti-miR-31; HG anti-miR-31: células mantidas em meio de cultura HG, transfectadas com anti-miR-31. Diferenças estatisticamente significativas: * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$; *** $P > 0,0001$.

4.3.1 A supressão de miR-31 aumenta a direcionalidade celular e diminui a velocidade de migração

Para avaliar se a inibição do miR-31 poderia restaurar o fenótipo migratório das células mantidas em HG, células NIH-3T3 transfectadas com o inibidor deste miRNA (anti-miR-31) foram submetidas à avaliação da migração celular por microscopia de *time-lapse*.

Conforme esperado, células mantidas em HG exibiram uma redução significativa na velocidade de migração em relação ao grupo LG (~56%). Diferença semelhante foi observada entre os grupos LG e HG após transfecção com o controle negativo do anti-miR (~53% de diminuição da velocidade em LG Neg *versus* HG Neg), assim como entre os grupos LG e HG transfectados com o anti-miR-31 (~53% de

inibição em LG + anti-miR-31 *versus* HG + anti-miR-31). A inibição do miR-31 reduziu a velocidade celular nos grupos LG e HG transfectados, em comparação aos seus respectivos controles (Figura 10A).

Além da velocidade, outro parâmetro analisado foi a direcionalidade de migração frente à inibição do miR-31. Novamente, a exposição de células NIH-3T3 à HG durante 3 dias reduziu a direcionalidade de migração em 46% (LG *versus* HG). Também nos grupos LG e HG após transfecção com controle negativo do anti-miR houve diminuição de 40% (LG Neg *versus* HG Neg), e entre os grupos transfectados com anti-miR-31 a diferença foi de 64% (LG + anti-miR-31 *versus* HG + anti-miR-31), já que o anti-miR-31 aumentou a direcionalidade das células controle de forma significativa em aproximadamente 25%, quando comparadas às células sem tratamento (LG) ou transfectadas com controle negativo (LG Neg) (Figura 10B). Não houve alteração significativa da direcionalidade em células HG transfectadas com anti-miR-31.

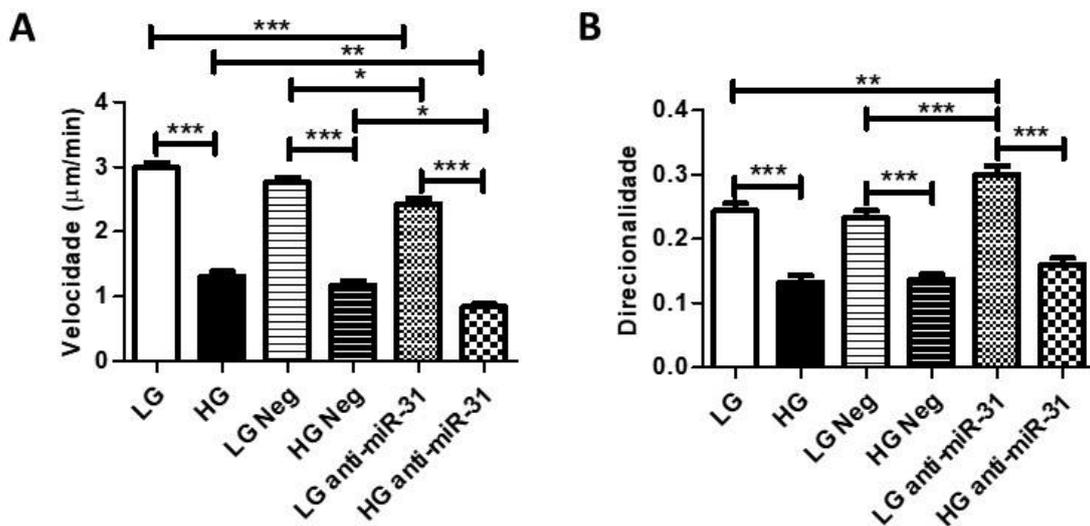


Figura 10. A supressão de miR-31-5p não alterou a velocidade celular e aumentou a direcionalidade de células NIH-3T3 do grupo controle. Células NIH-3T3 foram transfectadas com sequências sintéticas inibidoras do miR-31-5p (anti-miR-31), conforme descrito em Métodos. A migração celular foi avaliada por microscopia de time-lapse. (A) Velocidade celular e (B) Direcionalidade celular (D/T). Resultado obtido de quatro experimentos independentes e apresentados como média \pm EPM. LG: células mantidas em meio de cultura LG; HG: células mantidas em meio de cultura HG; LG Neg: células mantidas em meio LG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; HG NEG: células mantidas em meio de cultura HG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; LG anti-miR-31: células mantidas em meio de cultura LG, transfectadas com anti-miR-31; HG anti-miR-31: células mantidas em meio de cultura HG, transfectadas com anti-miR-31. Diferenças estatisticamente significantes: * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$; *** $P > 0,0001$.

4.3.2 A supressão de miR-31 aumenta a estabilidade das protrusões de membrana e a formação de fibras de estresse nas células

Após analisar a velocidade e direcionalidade de migração frente à inibição do miR-31, buscamos avaliar se o miR-31 é capaz de alterar a morfologia celular, especialmente a organização do citoesqueleto de actina, tendo como parâmetros de comparação as células cultivadas em meios LG e HG. Para isso, a formação e retração de protrusões foi analisada por microscopia de *time-lapse*, e células fixadas foram coradas com faloidina fluorescente, que se liga à actina polimerizada.

Conforme já observado anteriormente, a glicose elevada aumentou em 87% a quantidade de células que apresentavam mais de três protrusões simultâneas (100% da população em HG), quando comparadas ao grupo controle mantido em LG (apenas 13% da população). Efeito semelhante foi observado nas células transfectadas com controle negativo (aumento de 86% LG Neg *versus* HG Neg) e nas células transfectadas com anti-miR-31 (aumento de 89% LG + anti-miR-31 *versus* HG + anti-miR-31) (Figura 11A).

Também foi analisada a formação de protrusões de membrana durante 30 minutos (figura 11B) e sua estabilidade, por meio da avaliação da retração dessas protrusões (Figura 11C), utilizando a microscopia de *time-lapse*. Conforme descrito anteriormente, a exposição à glicose elevada aumentou em aproximadamente 18 vezes o número de protrusões formadas ao longo de 30 minutos (Figura 11B), em comparação ao grupo controle; estas protrusões também retraíam com maior frequência (Figura 11C). O mesmo fato foi observado entre os grupos transfectados com controle negativo para o anti-miR (Figuras 11B e 11C).

A inibição do miR-31 reduziu significativamente o número de protrusões formadas nas células expostas à HG por 3 dias, em comparação aos grupos mantidos em meio de cultura HG, embora ainda houvesse uma diferença em relação aos controles LG (Figura 11B). Essas protrusões também se mostraram mais estáveis após a inibição do miR-31, retraindo com menor frequência (~10 vezes menos retração) comparando-se aos controles HG (figura 11C). As células do grupo controle

mantidas em LG não exibiram diferença significativa no número de protrusões formadas, nem na retração (figura 11B).

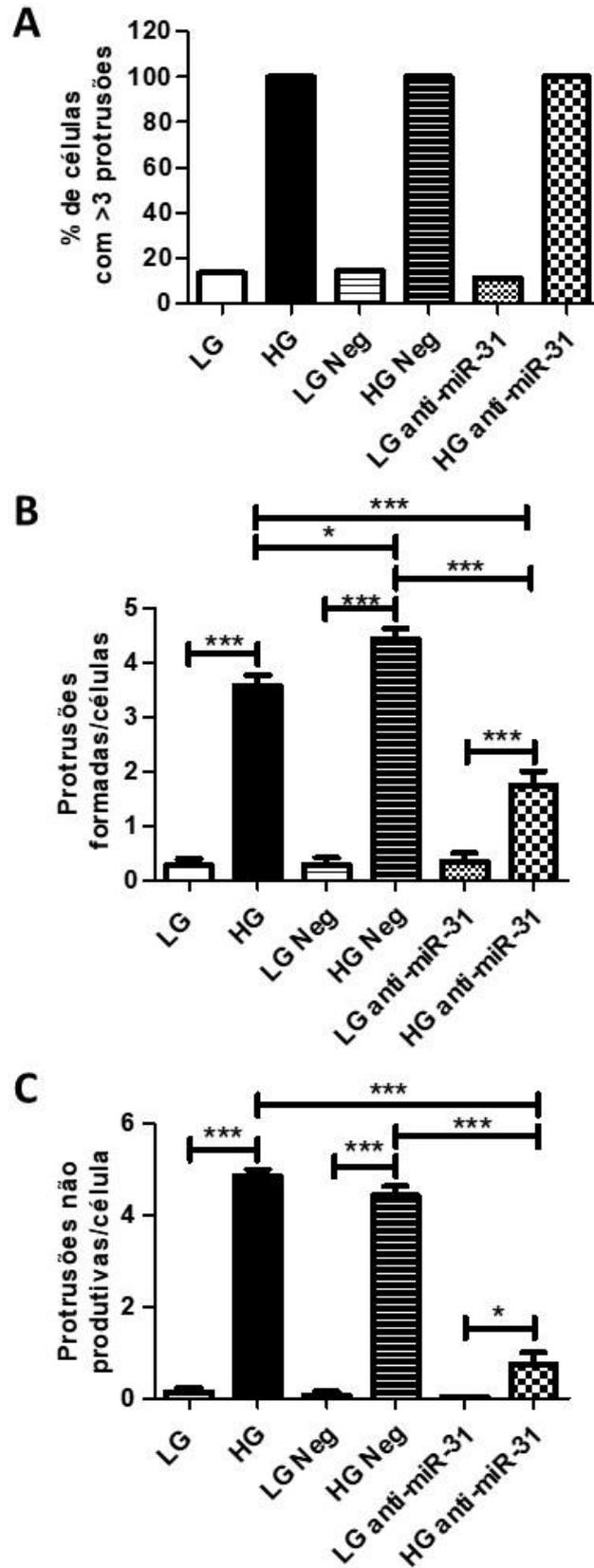


Figura 11. A supressão de miR-31-5p em células NIH-3T3 cultivadas com glicose elevada reduz o número de protrusões formadas e aumenta a sua estabilidade. Células NIH-3T3 foram transfectadas com sequências sintéticas inibidoras do miR-31-5p (anti-miR-31), conforme descrito em Métodos. A migração celular foi avaliada por microscopia de time-lapse. (A) Porcentagem de células com mais de 3 protrusões, (B) Número de protrusões formadas por célula durante 30 minutos e (C) número de protrusões em retração ao longo de 30 minutos, denominadas “protrusões não produtivas”. Resultado obtido de quatro experimentos independentes e apresentados como média \pm EPM. LG: células mantidas em meio de cultura LG; HG: células mantidas em meio de cultura HG; LG Neg: células mantidas em meio LG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; HG NEG: células mantidas em meio de cultura HG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; LG anti-miR-31: células mantidas em meio de cultura LG, transfectadas com anti-miR-31; HG anti-miR-31: células mantidas em meio de cultura HG, transfectadas com anti-miR-31. Diferenças estatisticamente significantes: *P> 0,05; **P> 0,01; ***P> 0,0001.

Também foi realizada a análise do citoesqueleto de actina, para observação da morfologia celular e correlação com o fenótipo migratório observado nos diferentes grupos (Figura 12).

Conforme descrição prévia, observou-se a presença de protrusões celulares simultâneas e em diferentes direções, acompanhada de menor polaridade nos grupos mantidos em HG, quando comparado aos grupos controle LG.

Em ambos os grupos, LG e HG, a inibição de miR-31 promoveu um aumento da quantidade de fibras de estresse, que são feixes intracelulares contráteis contendo F-actina, miosina II e outras proteínas acessórias (Figura 12). Um outro efeito comum aos dois grupos (LG e HG) foi um aumento da área celular após inibição do miR-31. No grupo LG foram observadas células mais alongadas e bem polarizadas, enquanto no grupo HG houve um aparente espraiamento, acompanhado de maior dinâmica de lamelipódios (*ruffling*). As células expostas à glicose elevada não se tornaram mais polarizadas após inibição do miR-31 (Figura 12).

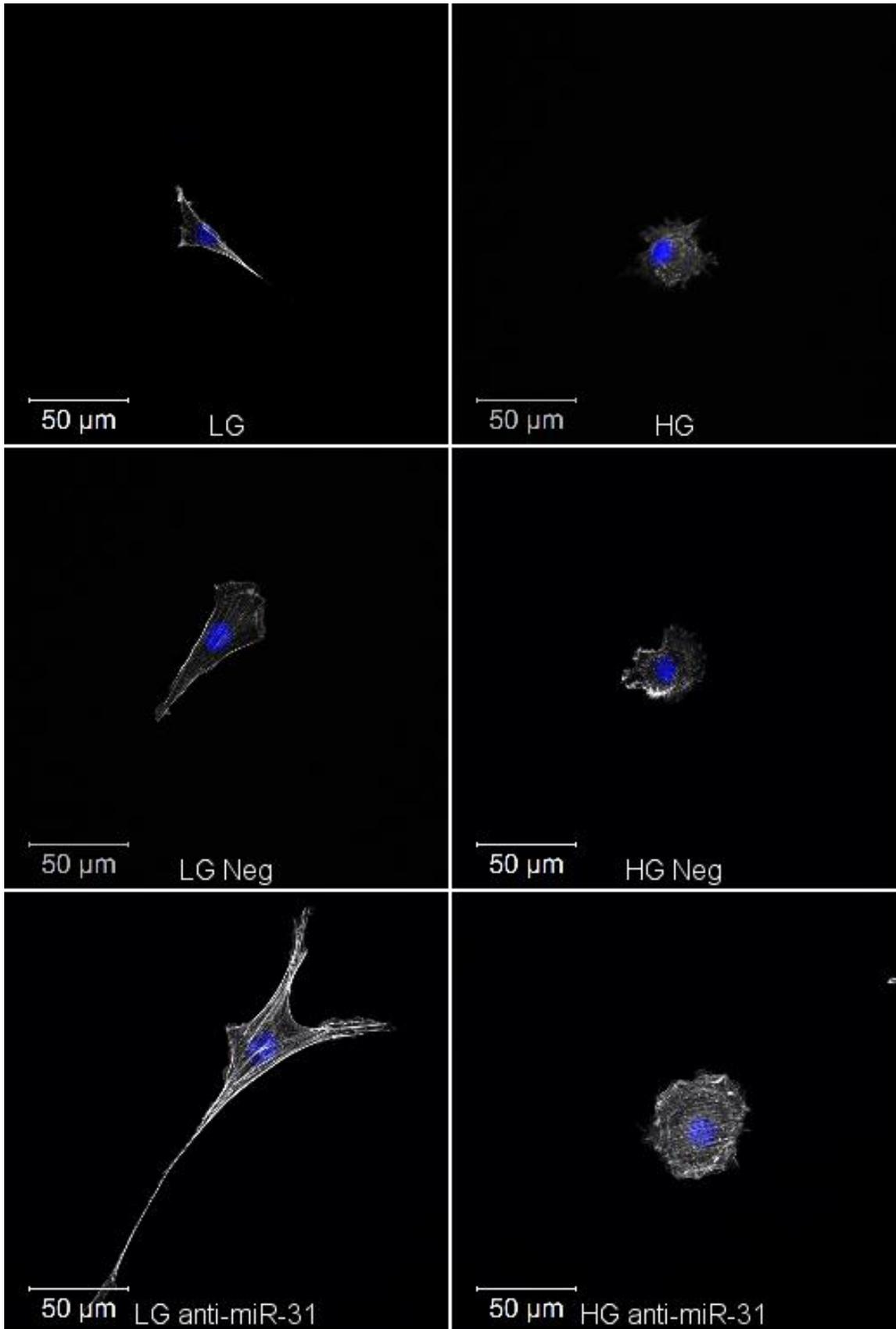


Figura 12. A supressão de miR-31-5p em células NIH-3T3 promove a formação de fibras de estresse e aumenta o tamanho das células. Células NIH-3T3 foram transfectadas com sequências sintéticas inibidoras do miR-31-5p (anti-miR-31), conforme descrito em Métodos. O citoesqueleto de actina foi analisado após fixação e coloração com faloidina fluorescente (cor branca). Os núcleos foram corados com DAPI (azul). LG: células mantidas em meio de cultura LG; HG: células mantidas em meio de cultura HG; LG Neg: células mantidas em meio LG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; HG NEG: células mantidas em meio de cultura HG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; LG anti-miR-31: células mantidas em meio de cultura LG, transfectadas com anti-miR-31; HG anti-miR-31: células mantidas em meio de cultura HG, transfectadas com anti-miR-31.

4.3.3 A supressão de miR-31 aumenta a expressão proteica de ROCK 1, ROCK 2 E RDX

Com o objetivo de investigar os mecanismos pelos quais a supressão de miR-31 poderia influenciar no fenótipo migratório, células NIH-3T3 mantidas em meio LG ou HG foram transfectadas com anti-miR-31 para análise da expressão proteica por *Western Blotting*, conforme descrito em Métodos. Foi feita a análise da expressão proteica de ROCK 1, ROCK 2 e RDX, três potenciais alvos do miR-31 já analisados nos experimentos anteriores.

As células transfectadas com anti-miR-31 mostraram um aumento na expressão proteica de ROCK 1 (45%), ROCK 2 (40%) e RDX (20%), em relação aos respectivos grupos LG e HG transfectados com controle negativo (Figura 13A, 13B e 13C). Estes resultados sugerem que o miR-31 pode ter uma função importante no citoesqueleto de actina, possivelmente através destes potenciais efetores. A supressão de miR-31, isoladamente, no entanto, não foi capaz de melhorar a migração das células expostas à glicose elevada.

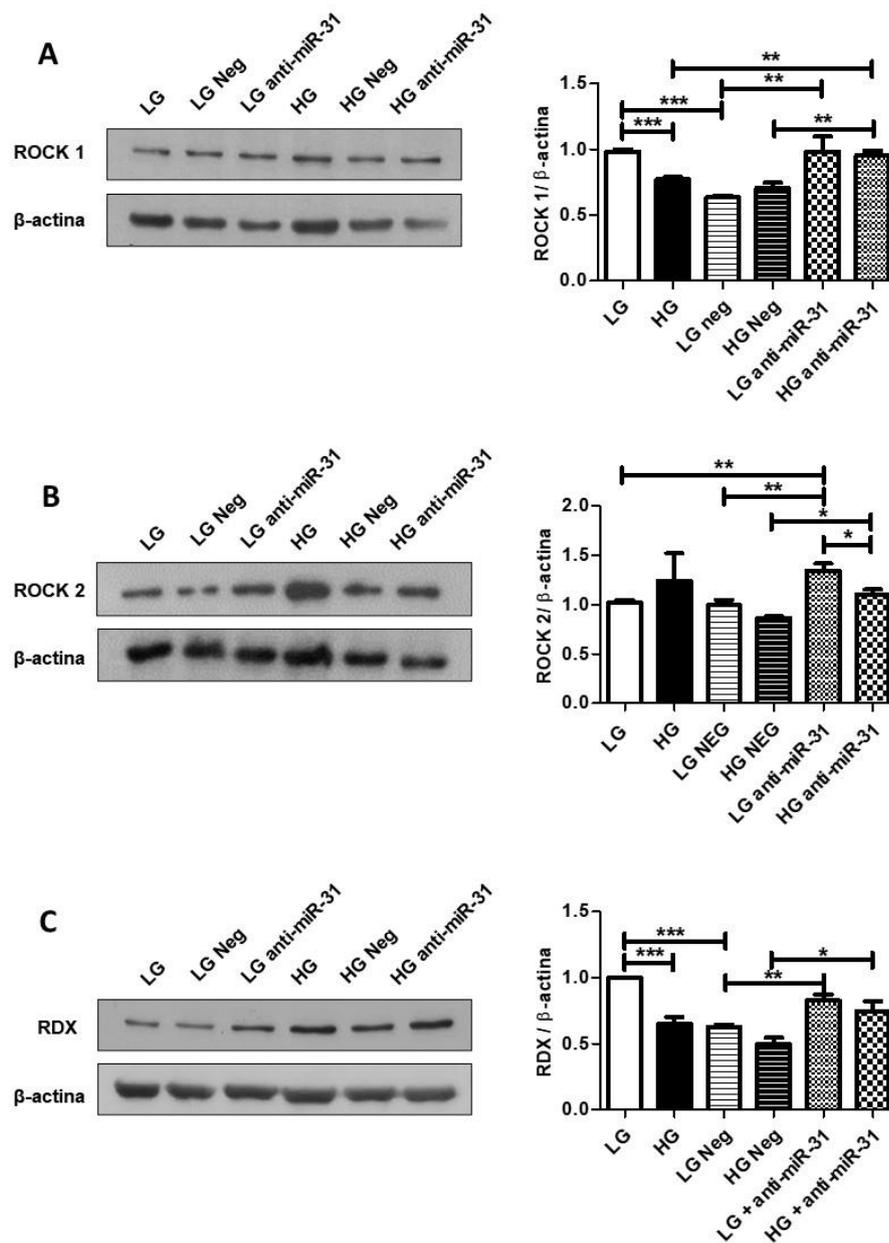


Figura 13. A supressão de miR-31-5p em células NIH-3T3 aumenta a expressão proteica de ROCK 1, ROCK 2 e RDX. Células NIH-3T3 foram transfectadas com sequências sintéticas inibidoras do miR-31-5p (anti-miR-31), conforme descrito em Métodos. A expressão proteica de (A) ROCK 1; (B) ROCK 2 e (C) RDX foi analisada por *Western Blotting*, e a densitometria das bandas foi feita utilizando o programa FIJI - ImageJ. Resultado obtido de quatro experimentos independentes. LG: células mantidas em meio de cultura LG; HG: células mantidas em meio de cultura HG; LG Neg: células mantidas em meio LG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; HG NEG: células mantidas em meio de cultura HG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; LG anti-miR-31: células mantidas em meio de cultura LG, transfectadas com anti-miR-31; HG anti-miR-31: células mantidas em meio de cultura HG, transfectadas com anti-miR-31. Diferenças estatisticamente significantes: * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$; *** $P > 0,0001$.

4.4 Padronização e Ensaio de luciferase

Com base nos resultados já descritos sobre os efeitos da concentração elevada de glicose sobre a expressão de potenciais alvos do miR-31 como ROCK 1, ROCK 2 e RDX e, também nos resultados de expressão proteica destes potenciais alvos após superexpressão e supressão de miR-31, decidimos fazer ensaios de validação, com o intuito de comprovar o papel regulatório de miR-31 na expressão dessas proteínas. Os resultados sugerem que os alvos citados possivelmente são regulados pelo miR-31 de maneira direta, através do seu pareamento com regiões *seed* presentes na 3'UTR do RNAm destas proteínas. Para analisar se esta afirmação é correta, o pareamento do miR-31 com as sequências de ROCK 1 e RDX foi avaliado por meio do ensaio de luciferase. Uma vez que ROCK 2 não teve sua expressão proteica comprovadamente reduzida em HG, o seu pareamento com o miR-31 não foi avaliado neste estudo.

Os oligonucleotídeos das regiões 3'UTR de ROCK 1 e RDX, bem como de suas formas mutadas para uso como controles, foram desenhados com apenas 22 nucleotídeos (mesmo tamanho da sequência madura de miR-31-5p), contendo a *seed sequence* predita em bancos de dados de bioinformática, e inseridas em vetores pmiRGlo para expressão da região 3'UTR destas proteínas junto ao gene da luciferase. Para os oligonucleotídeos mutados foram modificadas todas as bases da *seed sequence*, e aquelas que potencialmente pudessem parear com a sequência do miR-31-5p por meio da troca por bases idênticas às bases presentes na sequência do miR-31, impedindo seu pareamento (Figura 5). Os respectivos vetores, em seguida, foram co-transfectados com a sequência exógena de miR-31 (mimic) para superexpressão em células NIH-3T3. Após 24 horas da transfecção, foram coletadas amostras de RNA para confirmação da superexpressão do miRNA e de lisado celular para análise em um luminômetro.

Verificou-se que a expressão de miR-31 foi ~150 vezes maior nos grupos transfectados com mimic, em relação aos demais grupos (figura 14).

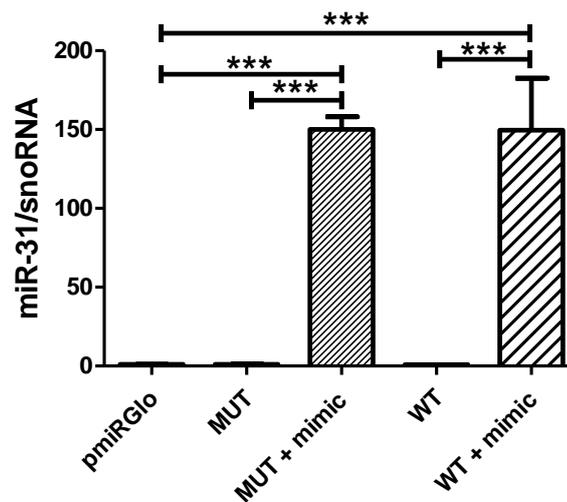


Figura 14. Superexpressão de miR-31-5p em linhagem NIH-3T3 para o ensaio de luciferase. Células NIH-3T3 foram co-transfectadas com seqüências sintéticas de miR-31-5p (mimic) e com os plasmídeos contendo as seqüências mutada e selvagem da 3' UTR de ROCK 1 ou RDX, conforme descrito em Métodos. A expressão do miR-31 foi avaliada por PCR em tempo real. Resultado obtido de quatro experimentos independentes. pmiRGlo: plasmídeo vazio; MUT: seqüência mutada da 3' UTR do RNAm alvo; WT: seqüência selvagem da 3' UTR do RNAm alvo. Diferenças estatisticamente significantes: *** $P > 0,0001$.

4.4.1 ROCK 1 é alvo indireto de miR-31-5p

O ensaio de luciferase de ROCK 1 não mostrou diferença significativa entre os grupos analisados (Figura 15). Portanto, em células NIH-3T3 pode-se concluir que o miR-31 não tem como alvo direto o sítio testado do RNAm de ROCK 1.

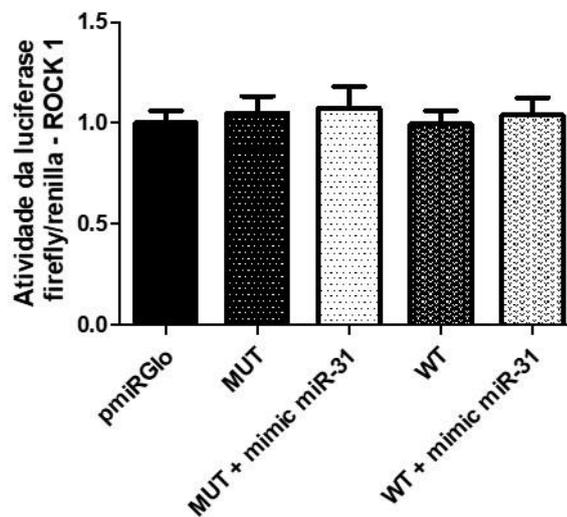


Figura 15. Ensaio de luciferase para validação de ROCK 1. Células NIH-3T3 foram co-transfectadas com o plasmídeo contendo um trecho da região 3' UTR de ROCK 1, e com o mimic miR-31. O lisado celular foi coletado e analisado em luminômetro, e a atividade da firefly luciferase foi quantificada de maneira proporcional à renilla, codificada no mesmo plasmídeo com um promotor independente. pmiRGlo: plasmídeo vazio; MUT: sequência mutada da 3' UTR do RNAm alvo; WT: sequência selvagem da 3' UTR do RNAm alvo. Resultados obtidos de três experimentos independentes.

4.4.2 Radixina é alvo direto de miR-31-5p

Diferente de ROCK 1, o ensaio de luciferase para validação da RDX mostrou que houve uma redução de 13% na atividade de luciferase quando as células foram transfectadas com o plasmídeo WT juntamente com o mimic miR-31, em comparação ao controle WT. Os grupos transfectados com o plasmídeo contendo a sequência mutada da 3' UTR de RDX mostraram um aumento na atividade de luciferase, em relação aos demais grupos (Figura 16). Esta observação sugere que, por algum motivo, a sequência mutada inserida pode ter favorecido a tradução da proteína luciferase contida nestes plasmídeos, de maneira independente da superexpressão do mimic miR-31.

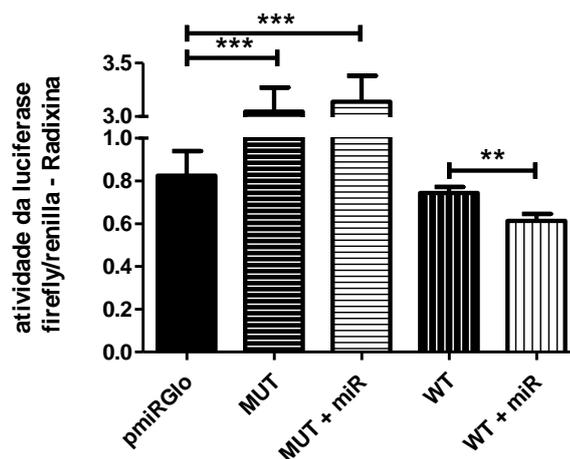


Figura 16. Ensaio de luciferase para validação de RDX. Células NIH-3T3 foram co-transfectadas com o plasmídeo contendo um trecho da região 3' UTR de RDX, e com o mimic miR-31. O lisado celular foi coletado e analisado em luminômetro, e a atividade da firefly luciferase foi quantificada de maneira proporcional à renilla, codificada no mesmo plasmídeo com um promotor independente. pmiRGlo: plasmídeo vazio; MUT: sequência mutada da 3' UTR do RNAm alvo; WT: sequência selvagem da 3' UTR do RNAm alvo. Resultados obtidos de dois experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significantes: ** $P > 0,01$; *** $P > 0,0001$, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

4.5 Padronização da transfecção com paxillin-pEGFP, e estudo da maturação de adesões focais por microscopia TIRF

Conforme mencionado anteriormente, os efeitos da superexpressão ou inibição exógena do miR-31 em fibroblastos se manifestam principalmente através do aumento de formação de protrusões simultâneas e em diferentes direções, e na estabilidade dessas protrusões. Em hipótese, os dados obtidos até o momento sugerem que a superexpressão do miR-31 poderia prejudicar a maturação de adesões focais da célula à matriz extracelular, fazendo com que as protrusões retraiam com maior frequência. A supressão deste miRNA teria efeito oposto, contribuindo para a maior maturação das adesões, estabilizando as protrusões. A análise da maturação de adesões, portanto, é importante para elucidar o mecanismo pelo qual a superexpressão do miR-31 pode contribuir para o prejuízo na migração observado em células expostas à HG. Além disso, ROCK 1 é uma proteína importante para a maturação de adesões (Yoneda et al, 2005).

4.5.1 A exposição a uma elevada concentração de glicose prejudica a formação e a maturação de adesões em células NIH-3T3, por um mecanismo dependente de agentes oxidantes

Foi inicialmente analisado o comportamento das adesões celulares em células NIH-3T3 em LG e HG, na presença ou não de NAC, conforme descrito em Métodos. A análise das adesões mostrou que células em HG apresentam menos adesões, em comparação a células em LG ($67,09 \pm 10,08$ em LG *versus* $32,00 \pm 4,40$ em HG). Houve aumento do número de adesões na presença de NAC (LG + NAC $110,0 \pm 12,42$ HG + NAC $104,0 \pm 12,24$). Este resultado indica que espécies reativas de oxigênio (EROs) derivadas do metabolismo celular fisiológico e também do aumento do

metabolismo da glicose são importantes para o processo de formação de adesões (Figura 17).

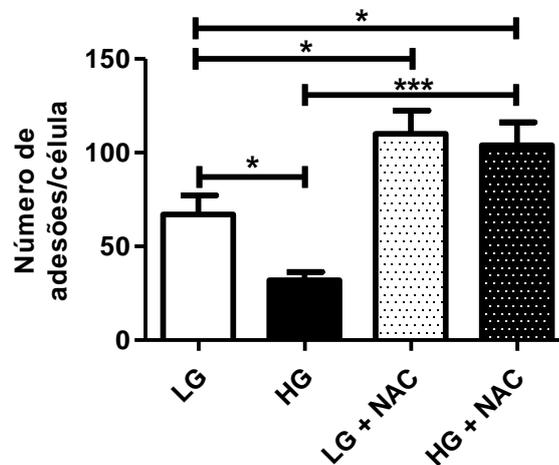


Figura 17. A elevada concentração de glicose reduz o número de adesões em células NIH-3T3 por mecanismos que envolvem agentes oxidantes. Células NIH-3T3 foram cultivadas durante 3 dias em LG ou HG, na presença ou ausência do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) 5 mM e transfectadas com paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas em células vivas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. Resultados obtidos de dois experimentos independentes, apresentados como média ± EPM. Diferenças estatisticamente significativas: *P > 0,05; **P > 0,01; ***P > 0,0001, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

Para analisar a maturação das adesões, os parâmetros escolhidos foram a circularidade e a área das mesmas, aparentes pelo acúmulo da proteína Paxilina. As adesões nascentes são menores (menos de $1 \mu\text{m}^2$ de diâmetro), mais arredondadas e se desmontam após uma vida útil de cerca de 1 minuto, ou então podem amadurecer, se tornar mais alongadas, e formar grandes adesões focais ($10 \mu\text{m}^2$ ou mais) que persistem por vários minutos (Vicente-Manzanares et al.; 2011, Sun et al., 2014).

A exposição das células à HG reduziu o tamanho médio das adesões ($0,5268 \pm 0,0525 \mu\text{m}^2$ em LG *versus* $0,2718 \pm 0,0259 \mu\text{m}^2$ em HG) e aumentou o índice de circularidade médio das adesões ($0,6309 \pm 0,0135$ em LG *versus* $0,7552 \pm 0,0136$ em HG) (Figura 18). O NAC no grupo HG foi capaz de prevenir estes efeitos, já que as células apresentaram adesões mais alongadas (circularidade $0,7552 \pm 0,0136$ em HG *versus* $0,6102 \pm 0,0084$ em HG + NAC) e maiores (média de $0,2718 \pm 0,0259 \mu\text{m}^2$ em HG *versus* $0,6458 \pm 0,0357 \mu\text{m}^2$ em HG + NAC), o que sugere uma maior maturação

das adesões quando células em HG são expostas ao agente antioxidante (figura 18). O antioxidante também teve efeito no grupo LG, no qual houve aumento no tamanho das adesões ($0,5268 \pm 0,0525 \mu\text{m}^2$ em LG *versus* $0,7024 \pm 0,0331 \mu\text{m}^2$ em LG + NAC), sem efeitos sobre a circularidade ($0,6309 \pm 0,0135$ em LG *versus* $0,6190 \pm 0,0081$ em LG + NAC), indicando que o uso do antioxidante tem efeito também na maturação das adesões em uma concentração fisiológica de glicose.

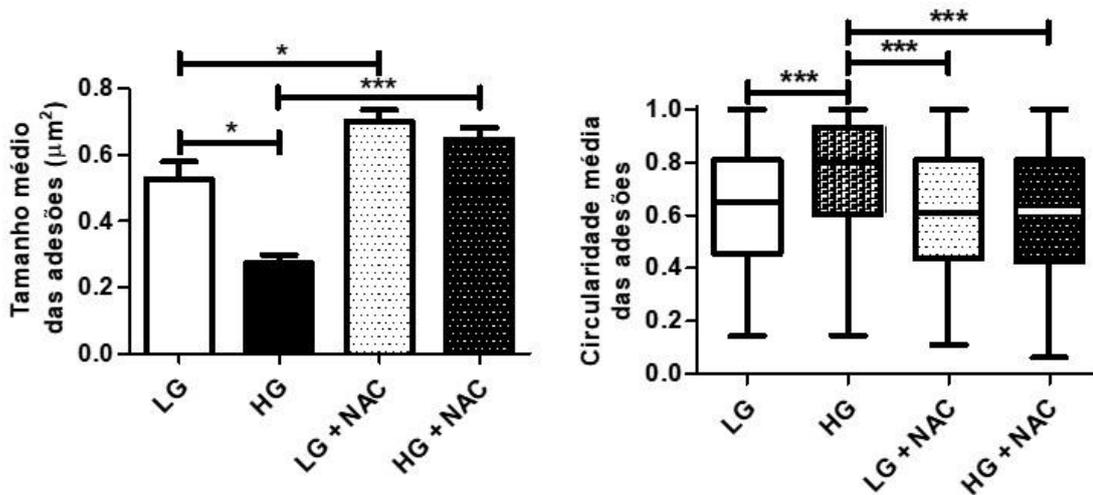


Figura 18. A concentração elevada de glicose reduz o tamanho e aumenta a circularidade das adesões, por mecanismos que envolvem agentes oxidantes. Células NIH-3T3 foram cultivadas durante 3 dias em LG ou HG, na presença ou ausência do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) 5 mM e transfetadas com paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas em células vivas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. Resultados obtidos de dois experimentos independentes, apresentados como média \pm EPM. Diferenças estatisticamente significantes: * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$; *** $P > 0,0001$, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

Buscando uma melhor compreensão deste efeito, foram avaliadas separadamente as adesões de área menor que $1 \mu\text{m}^2$, consideradas adesões nascentes ou complexos focais, das adesões maiores que $1 \mu\text{m}^2$, classificadas aqui como adesões focais (áreas inferiores a $0,03 \mu\text{m}^2$ foram excluídas, por serem consideradas marcação inespecífica). A partir disso, considerando-se o número de adesões por célula (figura 17), foi analisada a proporção das adesões nascentes e complexos focais, em relação às adesões maduras, ou adesões focais (Figura 19). O grupo em HG apresentou adesões menores (não ultrapassam o tamanho de $1 \mu\text{m}^2$), indicando menor maturação (LG: 85% adesões nascentes e 15% adesões focais *versus* HG: 97% adesões nascentes e 3% de adesões focais). O antioxidante NAC

auxiliou na maturação das adesões (LG + NAC: 78% de adesões nascentes e 22% de adesões focais, HG + NAC: 80% de adesões nascentes e 20% de adesões focais).

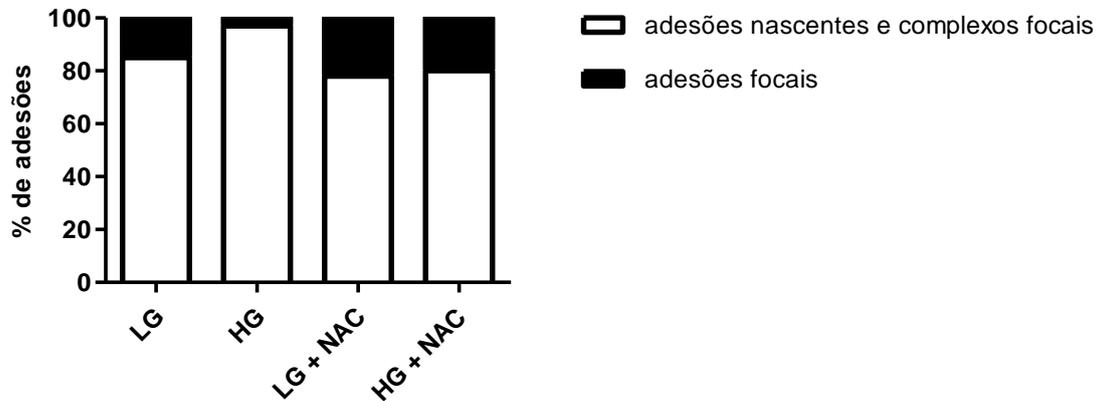


Figura 19. A concentração elevada de glicose aumenta a proporção de adesões nascentes em relação às adesões focais em células NIH-3T3 por mecanismos que envolvem agentes oxidantes. Células NIH-3T3 foram cultivadas durante 3 dias em LG ou HG, na presença ou ausência do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) 5 mM e transfectadas com paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas em células vivas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. Foram consideradas adesões nascentes aquelas $\leq 1 \mu\text{m}^2$ e adesões focais aquelas $\geq 1 \mu\text{m}^2$. Resultados obtidos de dois experimentos independentes.

As adesões nascentes e adesões focais foram também analisadas separadamente na sua morfologia. Além de ter menos adesões maduras, as células expostas à HG apresentaram adesões nascentes menores e mais circulares, quando comparadas aos demais grupos, sugerindo menor maturação (Figura 20). Entre as adesões maiores que $1 \mu\text{m}^2$, também houve uma redução no tamanho médio e um aumento na circularidade, indicando menor maturação em relação aos demais grupos. Estes efeitos foram novamente prevenidos com o uso do antioxidante (Figura 21).

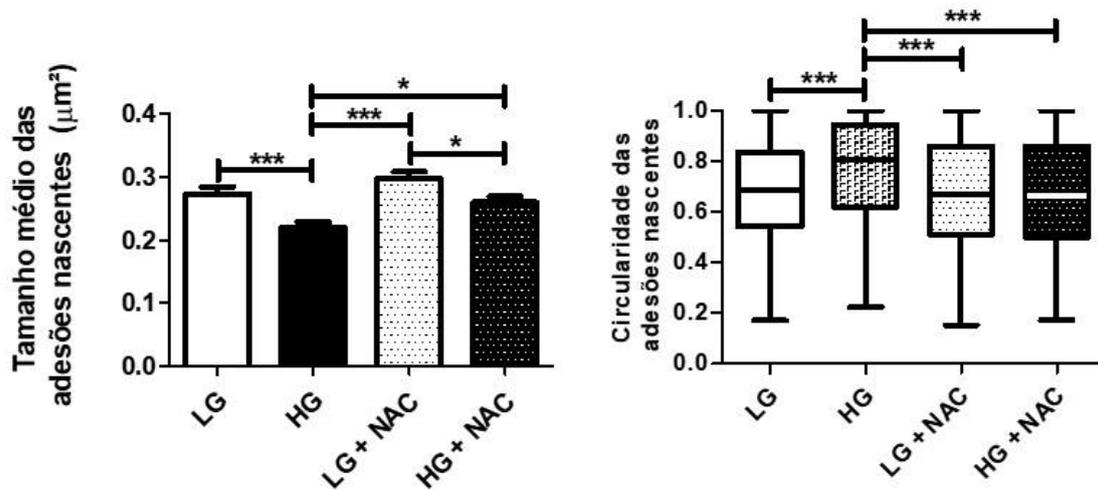


Figura 20. A concentração elevada de glicose reduz o tamanho das adesões nascentes e aumenta sua circularidade em células NIH-3T3, por meio de mecanismos que envolvem agentes oxidantes. Células NIH-3T3 foram cultivadas durante 3 dias em LG ou HG, na presença ou ausência do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) 5 mM e transfectadas com paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas em células vivas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados (tamanho e circularidade) foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. Resultados obtidos de dois experimentos independentes, apresentados como média \pm EPM. Foram avaliadas apenas adesões nascentes, com tamanho $\leq 1 \mu\text{m}^2$. Diferenças estatisticamente significantes: * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$; *** $P > 0,0001$, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

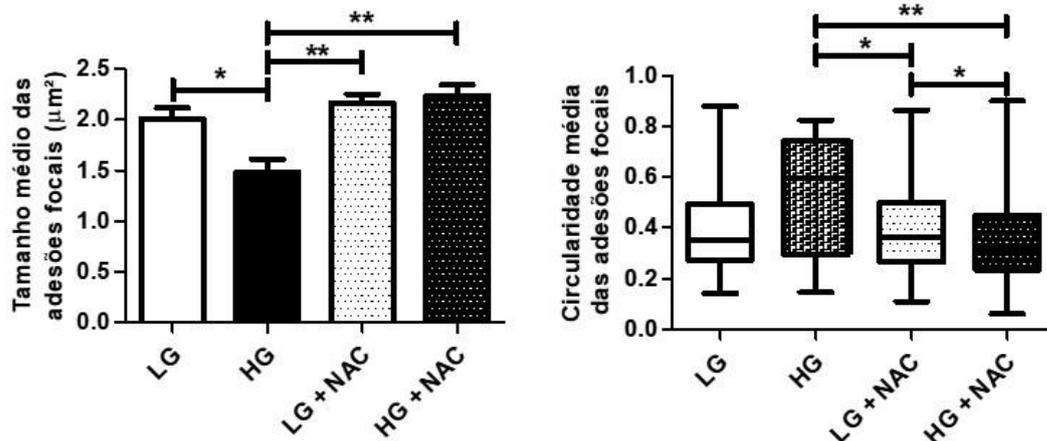


Figura 21. A concentração elevada de glicose reduz o tamanho das adesões focais e aumenta sua circularidade em células NIH-3T3, por meio de mecanismos que envolvem agentes oxidantes. Células NIH-3T3 foram cultivadas durante 3 dias em LG ou HG, na presença ou ausência do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) 5 mM e transfectadas com paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas em células vivas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados (tamanho e circularidade) foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. Resultados obtidos de dois experimentos independentes, apresentados como média \pm EPM. Foram avaliadas apenas adesões focais, com tamanho $\geq 1 \mu\text{m}^2$. Diferenças estatisticamente significantes: * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$; *** $P > 0,0001$, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

Buscamos também observar a localização das adesões nas imagens obtidas por microscopia TIRF. Para isso, foram selecionadas apenas as adesões com área acima de $1 \mu\text{m}^2$ para todos os grupos, consideradas adesões focais, já que o acúmulo de paxilina sugere maior maturação. As imagens obtidas mostram que as células LG exibiam mais adesões maduras no limite anterior da célula, bem como na região da cauda. Poucas adesões acima do tamanho selecionado foram observadas no corpo da célula. Já no grupo HG não foi observada nenhuma adesão madura. O NAC em células HG preveniu este efeito, uma vez que as adesões apresentavam localização semelhante às do grupo LG. Já no grupo LG em presença do antioxidante, foram observadas muitas adesões grandes e alongadas, presentes inclusive no corpo celular (figura 22).

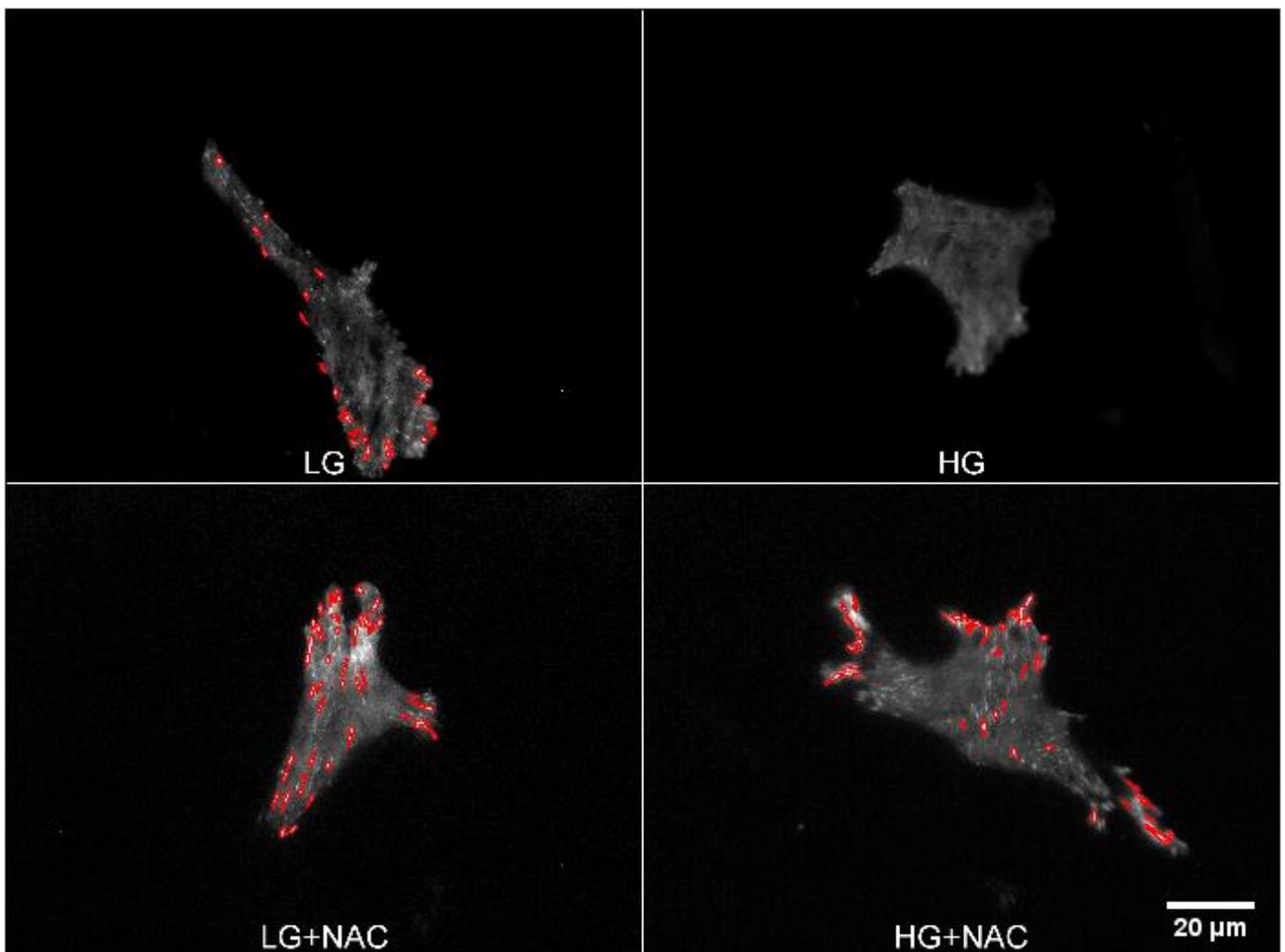


Figura 22. A concentração elevada de glicose reduz drasticamente a existência de adesões focais em células NIH-3T3, por meio de mecanismos que envolvem agentes oxidantes. Células NIH-3T3 foram cultivadas durante 3 dias em LG ou HG, na presença ou ausência do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) 5 mM e transfectadas com paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas em células vivas por microscopia TIRF. Resultados obtidos de dois experimentos independentes. Foram avaliadas apenas adesões focais, com tamanho $\geq 1 \mu\text{m}^2$, evidenciadas em vermelho.

4.5.2 A super expressão de miR-31 em células NIH-3T3 prejudica a formação e a maturação de adesões

Para relacionar os efeitos observados em HG com a superexpressão de miR-31, foi feita a co-transfecção do mimic-miR-31-5p, junto ao plasmídeo de paxillin-pEGFP, e as adesões celulares foram analisadas em células vivas utilizando microscopia TIRF. A superexpressão do miR-31 reduziu o número de adesões por célula, em relação aos controles (LG: $59,22 \pm 5,32$, Neg: $92,64 \pm 16,34$, mimic miR-31 $18,20 \pm 4,90$, Figura 23).

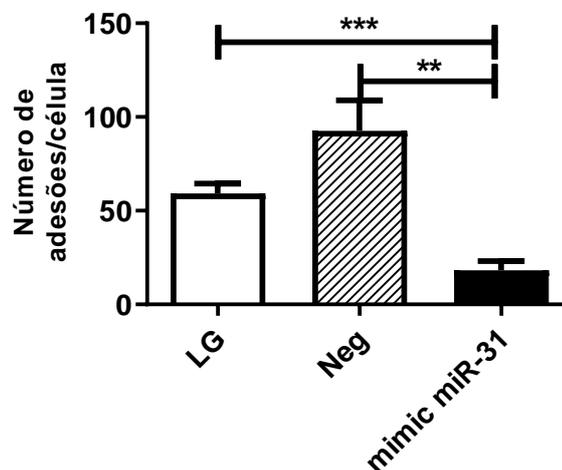


Figura 23. A super expressão de miR-31 reduz o número de adesões em células NIH-3T3. Células NIH-3T3 cultivadas em condições normoglicêmicas (LG) foram co-transfectadas com mimic-miR-31-5p e paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados (número de adesões) foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. Resultado obtido de dois experimentos independentes, apresentados como média \pm EPM. *P > 0,05; **P > 0,01; ***P > 0,0001, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

A superexpressão do miR-31 também aumentou a circularidade das adesões (média de $0,6503 \pm 0,0133$ em LG, $0,6619 \pm 0,0082$ em Neg e $0,7751 \pm 0,0206$ em mimic miR-31) (Figura 24). Também houve redução no tamanho das adesões (média de $0,8614 \pm 0,0765 \mu\text{m}^2$ em LG, $0,4816 \pm 0,0323 \mu\text{m}^2$ em Neg e $0,1603 \pm 0,0184 \mu\text{m}^2$ em mimic miR-31) (Figura 24), indicando que a superexpressão do miR-31 afetou negativamente a maturação das adesões.

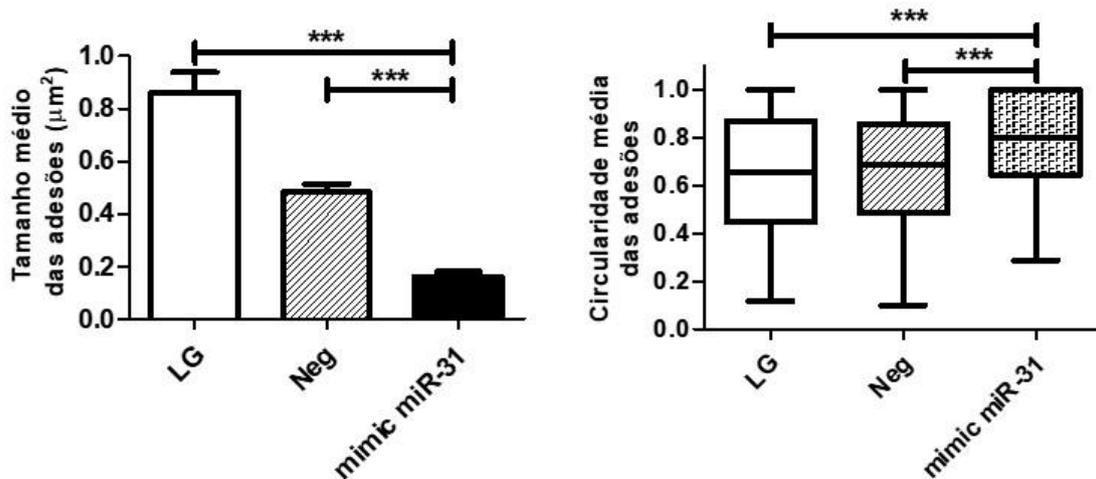


Figura 24. A superexpressão do miR-31 reduz o tamanho e aumenta a circularidade das adesões em células NIH-3T3. Células NIH-3T3 cultivadas em condições normoglicêmicas (LG) foram co-transfectadas com mimic-miR-31-5p e paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados (tamanho e circularidade) foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. Resultado obtido de dois experimentos independentes, apresentados como média \pm EPM. *P > 0,05; **P > 0,01; ***P > 0,0001, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

A análise da proporção de adesões nascentes e complexos focais, em relação às adesões maduras, ou adesões focais (Figura 25) mostrou que, das poucas adesões formadas pelas células superexpressando miR-31, nenhuma adesão ultrapassou o tamanho de $1 \mu\text{m}^2$, indicando que a maturação de adesões nessas células foi inibida (LG: 79% adesões nascentes e 21% adesões focais e Neg: 89% adesões nascentes e 11% de adesões focais *versus* mimic miR-31: 100% adesões nascentes).

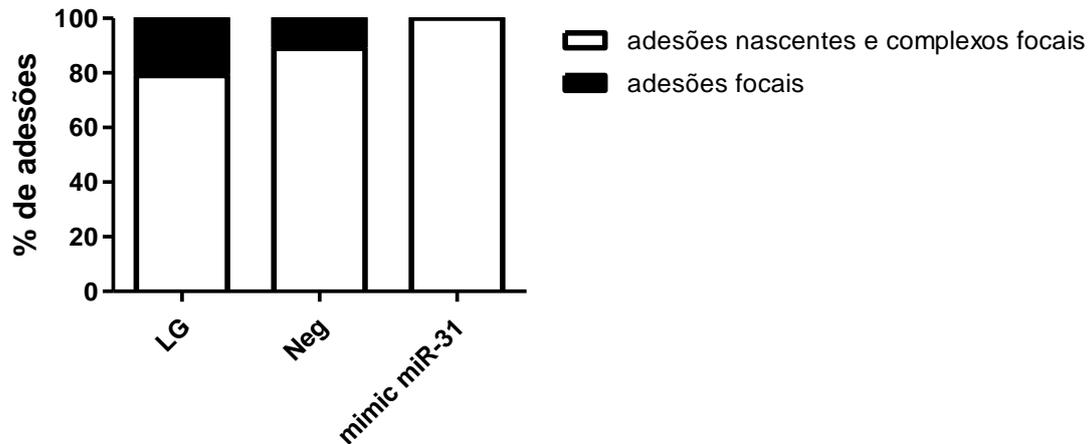


Figura 25. A superexpressão de miR-31 elimina as adesões focais em células NIH-3T3. Células NIH-3T3 cultivadas em condições normoglicêmicas (LG) foram co-transfectadas com mimic-miR-31-5p e paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. Foram consideradas adesões nascentes aquelas $\leq 1 \mu\text{m}^2$ e adesões focais aquelas $\geq 1 \mu\text{m}^2$. Resultados obtidos de dois experimentos independentes.

As adesões nascentes e adesões focais foram também avaliadas separadamente. Além de possuírem menos adesões, células com superexpressão do miR-31 apresentaram menor tamanho das adesões nascentes (área $0,2710 \pm 0,0119$ em LG, $0,2556 \pm 0,0087$ em Neg e $0,1603 \pm 0,0184$ em mimic miR-31) e maior circularidade (índice de circularidade $0,6953 \pm 0,0103$ em LG, $0,6990 \pm 0,0076$ em Neg e $0,7751 \pm 0,0206$ em mimic miR-31), sugerindo menor potencial de maturação (Figura 26).

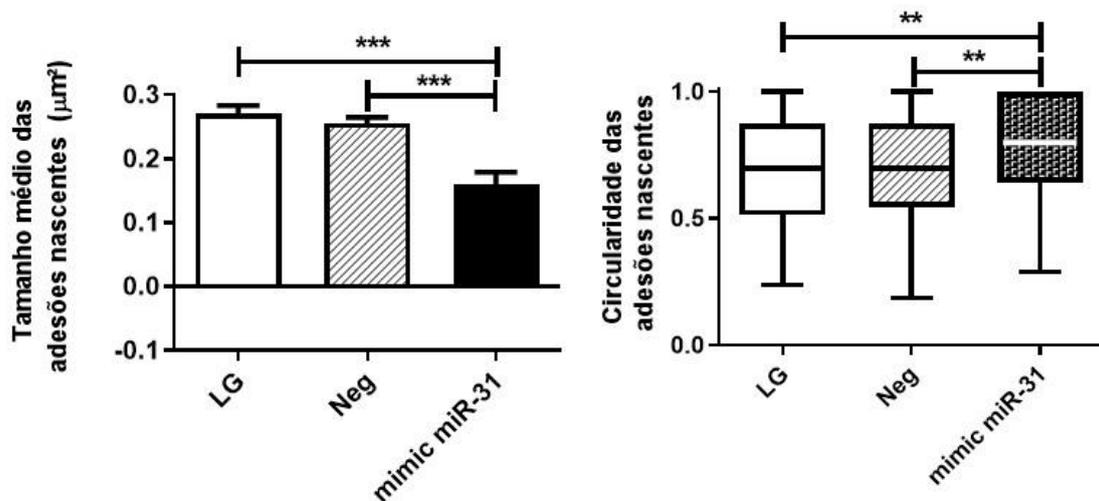


Figura 26. A superexpressão do miR-31 reduz o tamanho e aumenta a circularidade das adesões nascentes em células NIH-3T3. Células NIH-3T3 cultivadas em condições normoglicêmicas (LG) foram co-transfectadas com mimic-miR-31-5p e paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados (tamanho e circularidade) foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. Foram consideradas adesões nascentes aquelas $\leq 1 \mu\text{m}^2$. Resultado obtido de dois experimentos independentes, apresentados como média \pm EPM. * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$; *** $P > 0,0001$, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

Já as adesões focais estavam completamente ausentes nas células transfectadas com mimic-miR-31 analisadas, indicando deficiência na maturação das adesões. Houve uma pequena redução do tamanho das adesões no controle negativo (área $3,106 \pm 0,2758$ em LG *versus* $2,305 \pm 0,1981$ em Neg), enquanto a circularidade não foi afetada (índice de circularidade de $0,3608 \pm 0,0145$ em LG *versus* $0,3267 \pm 0,01499$ em Neg) (Figura 27).

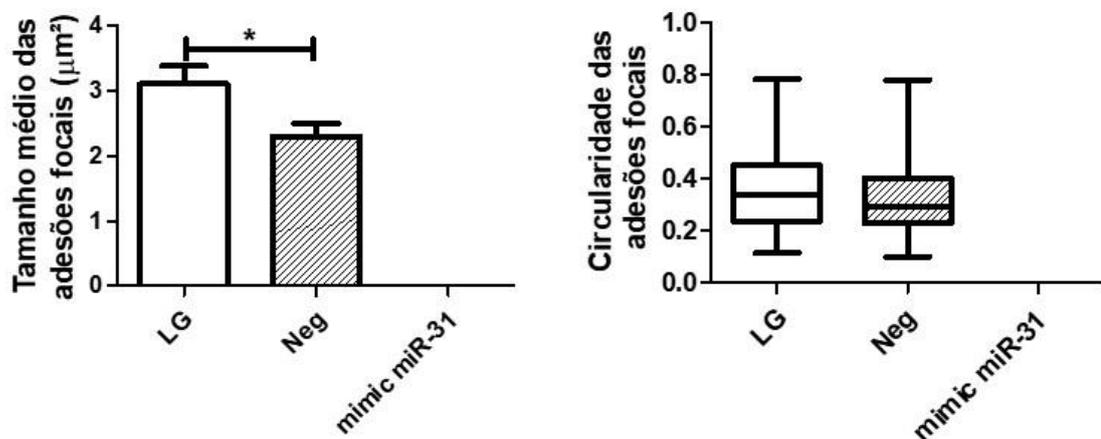


Figura 27. A superexpressão do miR-31 elimina as adesões focais em células NIH-3T3. Células NIH-3T3 cultivadas em condições normoglicêmicas (LG) foram co-transfectadas com

mimic-miR-31-5p e paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados (tamanho e circularidade) foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. Foram consideradas adesões focais aquelas $\geq 1 \mu\text{m}^2$. Resultado obtido de dois experimentos independentes, apresentados como média \pm EPM. * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$; *** $P > 0,0001$, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

As imagens obtidas (figura 28) mostram que as células dos grupos LG e Neg exibem mais adesões maduras no limite anterior da célula, bem como na região da cauda. Poucas adesões acima do tamanho selecionado ($1 \mu\text{m}^2$) foram observadas no corpo da célula. A superexpressão do miR-31 reduziu o número e o tamanho das adesões, uma vez que não foi observada nenhuma adesão marcada em vermelho.

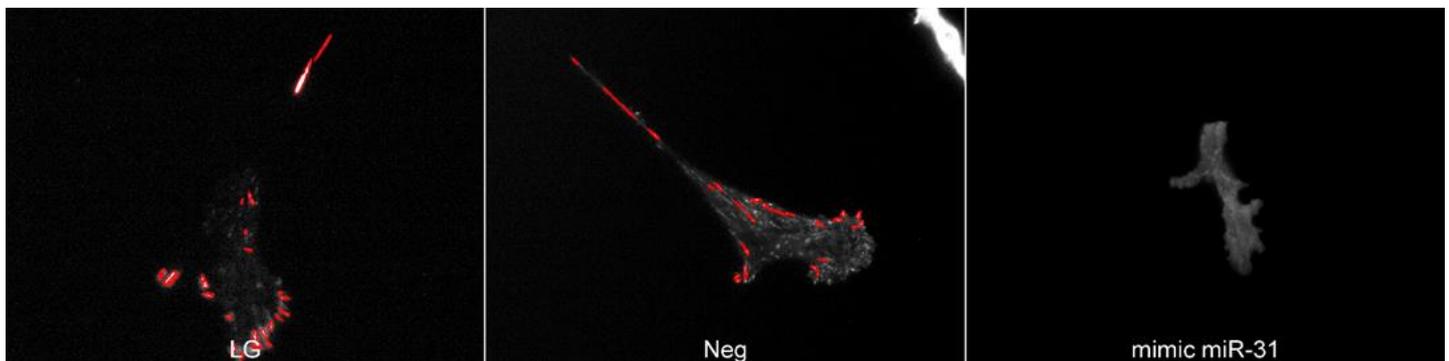


Figura 28. A super expressão do miR-31 elimina as adesões focais em células NIH-3T3. Células NIH-3T3 cultivadas em condições normoglicêmicas (LG) foram co-transfectadas com mimic-miR-31-5p e paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. Foram consideradas adesões focais aquelas $\geq 1 \mu\text{m}^2$, evidenciadas em vermelho. Resultados obtidos de dois experimentos independentes.

4.5.3 A supressão de miR-31 em NIH-3T3 aumenta a maturação de adesões, sem influenciar na formação de novas adesões

Para avaliar se os efeitos da HG sobre a formação e maturação de adesões poderia ser revertido com a inibição do miR-31, células NIH-3T3 mantidas em LG ou HG durante 3 dias foram co-transfectadas com a sequência sintética do inibidor de miR-31-5p (anti-miR-31), junto ao plasmídeo de paxillin-pEGFP, e as adesões celulares foram analisadas utilizando microscopia TIRF, conforme descrito em

Métodos. A exposição à HG reduziu o número de adesões por célula, em relação aos controles, em todas as condições analisadas. Não houve diferença significativa no número de adesões formadas após a inibição do miR-31, tanto em LG quanto em HG (LG: $58,88 \pm 9,57$; HG: $36,82 \pm 5,12$; LG Neg: $68,50 \pm 11,91$; HG Neg $30,29 \pm 4,29$, LG anti-miR-31: $49,00 \pm 6,38$; HG anti-miR-31: $26,29 \pm 4,61$) (Figura 29).

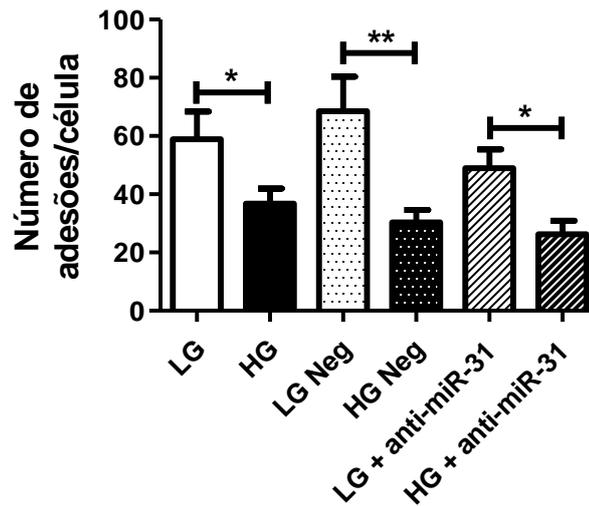


Figura 29. A supressão de miR-31 não altera o número de adesões em células NIH-3T3, independentemente da concentração de glicose no meio. Células NIH-3T3 cultivadas em condições normoglicêmicas (LG) ou hiperglicêmicas (HG) foram co-transfectadas com seqüências sintéticas inibidoras (anti-miR-31-5p) e paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados (número de adesões) foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. LG: células mantidas em meio controle (glicose 5 mM); HG: células mantidas em meio com elevada concentração de glicose (30 mM); LG Neg: células mantidas em meio LG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; HG Neg: células mantidas em meio HG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; LG anti-miR-31: células mantidas em meio LG e transfectadas com anti-miR-31; HG anti-miR-31: células mantidas em meio HG e transfectadas com anti-miR-31. Resultado obtido de dois experimentos independentes, apresentados como média \pm EPM. Diferenças significativas: * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$; *** $P > 0,0001$, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

Conforme esperado, a exposição das células à HG aumentou a circularidade das adesões (média de $0,7126 \pm 0,0107$ em LG *versus* $0,7633 \pm 0,0102$ em HG), além de reduzir o tamanho das mesmas (média de $0,6647 \pm 0,0443$ em LG *versus* $0,2744 \pm 0,0162 \mu\text{m}^2$ em HG) (Figura 30). Resultado semelhante foi observado nos grupos transfectados com o controle negativo LG Neg e HG Neg (média de circularidade $0,6017 \pm 0,0144$ em LG Neg *versus* $0,7862 \pm 0,0135$ em HG Neg), também com redução no tamanho das adesões (média de $0,6549 \pm 0,0623 \mu\text{m}^2$ em LG Neg *versus*

0,3734 \pm 0,0355 μm^2 em HG Neg). A supressão do miR-31 em células NIH-3T3 LG diminuiu a circularidade das adesões em relação a LG, mas não a LG Neg (média de circularidade 0,7126 \pm 0,0107 em LG; 0,6017 \pm 0,0144 em LG Neg e 0,6446 \pm 0,0122 em LG + anti-miR-31). Também não houve alteração significativa no tamanho médio das adesões nos grupos LG (média de 0,6647 \pm 0,0443 μm^2 em LG; 0,6549 \pm 0,0623 μm^2 em LG Neg e 0,7256 \pm 0,0519 μm^2 em LG + anti-miR-31), (figura 30).

A supressão do miR-31 em células NIH-3T3 em HG também diminuiu a circularidade média das adesões em comparação aos grupos HG e HG Neg (0,7633 \pm 0,0102 em HG; 0,7862 \pm 0,0135 em HG Neg e 0,6205 \pm 0,0188 em HG anti-miR-31) (Figura 30). Foi observado aumento relevante no tamanho das adesões (média de 0,2744 \pm 0,0162 μm^2 em HG; 0,3734 \pm 0,0355 μm^2 em HG Neg e 1,556 \pm 0,1548 μm^2 em HG + anti-miR-31) (Figura 30), mostrando que a supressão do miR-31 aumentou a maturação das adesões, mesmo sob o estresse oxidativo promovido pelo metabolismo da glicose.

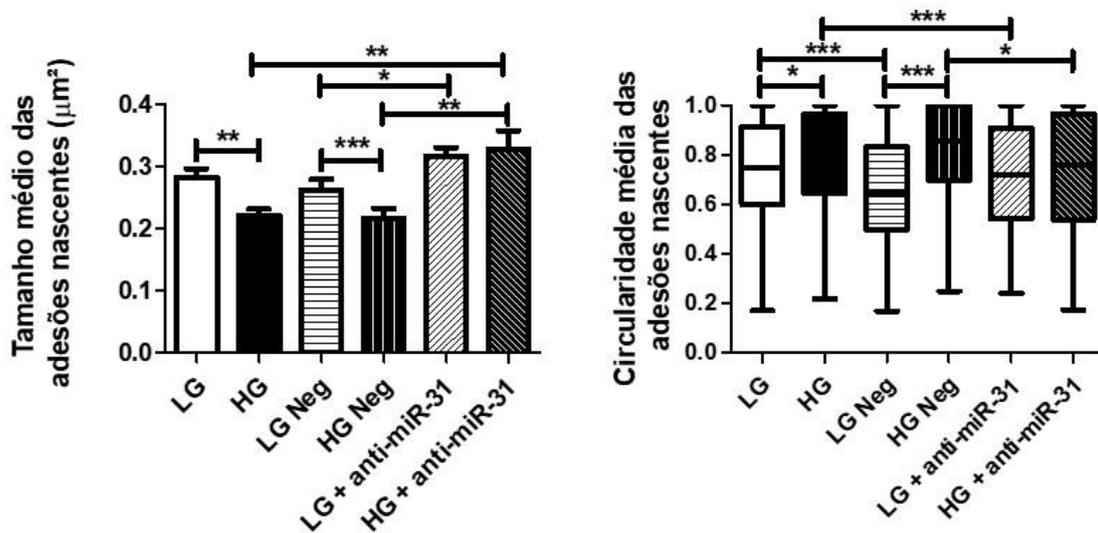


Figura 30. A supressão de miR-31 reduz a circularidade e aumenta o tamanho das adesões em células NIH-3T3 expostas a uma concentração elevada de glicose. Células NIH-3T3 cultivadas em condições normoglicêmicas (LG) ou hiperglicêmicas (HG) foram co-transfectadas com sequências sintéticas inibidoras (anti-miR-31-5p) e paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados (tamanho e circularidade de adesões) foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. LG: células mantidas em meio controle (glicose 5 mM); HG: células mantidas em meio com elevada concentração de glicose (30 mM); LG Neg: células mantidas em meio LG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; HG Neg: células mantidas em meio HG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; LG anti-miR-31: células mantidas em meio LG e transfectadas com anti-miR-31; HG anti-miR-31: células mantidas em meio HG e transfectadas com anti-miR-31. Resultado obtido de dois experimentos independentes, apresentados como média \pm

EPM. Diferenças significativas: *P> 0,05; **P> 0,01; ***P> 0,0001, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

As adesões foram consideradas separadamente de acordo com a área em adesões nascentes ou complexos focais (menores que $1 \mu\text{m}^2$) e adesões focais (maiores que $1 \mu\text{m}^2$). A partir disso, considerando o número de adesões por célula (figura 29), foi analisada a proporção das adesões nascentes/complexos focais e adesões focais, mais maduras.

Em LG e HG, bem como em LG Neg e HG Neg, foram observadas aproximadamente as mesmas proporções observadas nos experimentos anteriores para LG e HG (LG: 78% adesões nascentes e 22% adesões focais; HG: 95% adesões nascentes e 5% adesões focais; LG Neg: 79% adesões nascentes e 21% adesões focais; HG Neg: 89% adesões nascentes e 11% adesões focais) (Figura 31). A inibição do miR-31 aumentou o número de adesões maduras no grupo HG, porém sem o mesmo efeito no grupo LG (LG anti-miR-31: 80% adesões nascentes e 20% adesões focais; HG anti-miR-31: 61% adesões nascentes e 39% de adesões focais). Considerando-se que o número total de adesões não foi alterado pela supressão do miR-31, esses resultados sugerem que a inibição do miR-31 favorece a maturação de adesões em HG, porém sem influenciar na formação de novas adesões.

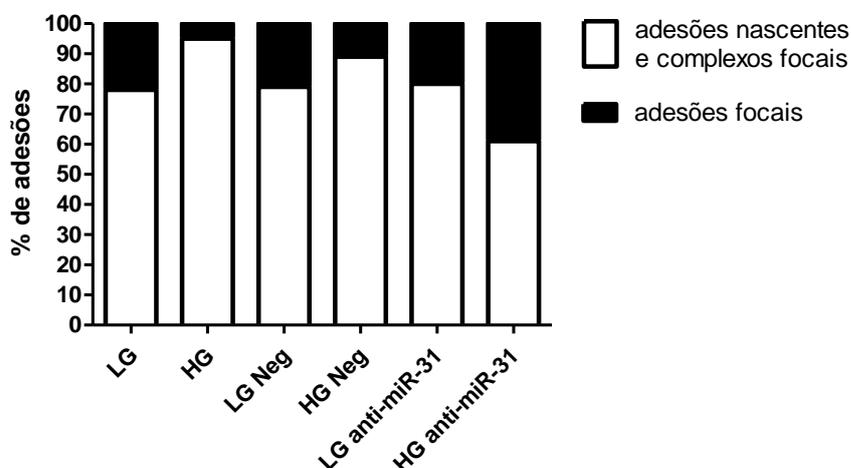


Figura 31. A supressão de miR-31 aumenta a maturação das adesões em células NIH-3T3 expostas a uma concentração elevada de glicose. Células NIH-3T3 cultivadas em condições normoglicêmicas (LG) ou hiperglicêmicas (HG) foram co-transfectadas com

sequências sintéticas inibidoras (anti-miR-31-5p) e paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados (tamanho de adesões) foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. LG: células mantidas em meio controle (glicose 5 mM); HG: células mantidas em meio com elevada concentração de glicose (30 mM); LG Neg: células mantidas em meio LG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; HG Neg: células mantidas em meio HG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; LG anti-miR-31: células mantidas em meio LG e transfectadas com anti-miR-31; HG anti-miR-31: células mantidas em meio HG e transfectadas com anti-miR-31. Resultado obtido de dois experimentos independentes, apresentados como porcentagem de adesões nascentes/complexos focais ($\leq 1 \mu\text{m}^2$) e adesões focais ($\geq 1 \mu\text{m}^2$).

As adesões nascentes e adesões maduras foram avaliadas separadamente e, novamente, no grupo HG as adesões nascentes são menores e mais arredondadas (área de $0,2834 \pm 0,0137 \mu\text{m}^2$ em LG *versus* $0,2213 \pm 0,0106 \mu\text{m}^2$ em HG, com índice de circularidade de $0,7377 \pm 0,0084$ em LG e $0,7720 \pm 0,0080$ em HG). A mesma proporção foi observada em LG Neg e HG Neg (área de $0,2634 \pm 0,0170 \mu\text{m}^2$ em LG Neg *versus* $0,2168 \pm 0,0160 \mu\text{m}^2$ em HG Neg, com circularidade de $0,6631 \pm 0,0150$ em LG Neg *versus* $0,8115 \pm 0,0133$ em HG Neg) (Figura 32).

A inibição do miR-31 promoveu um aumento na área das adesões nascentes em LG, quando comparado ao grupo LG Neg (LG: $0,2834 \pm 0,0137 \mu\text{m}^2$; LG Neg: $0,2634 \pm 0,0170 \mu\text{m}^2$ e LG + anti-miR-31: $0,3166 \pm 0,0151 \mu\text{m}^2$). Nas células em HG, também houve aumento do tamanho das adesões nascentes (HG: $0,2213 \pm 0,0106 \mu\text{m}^2$; HG Neg: $0,2168 \pm 0,0160 \mu\text{m}^2$ e HG anti-miR-31: $0,3291 \pm 0,0299 \mu\text{m}^2$). Houve redução na circularidade das adesões nascentes, tanto em LG quanto em HG, quando comparados aos controles negativos (LG: $0,7377 \pm 0,0084$; LG Neg: $0,6631 \pm 0,0150$; LG anti-miR-31: $0,7121 \pm 0,0120$; HG: $0,7720 \pm 0,0080$; HG Neg: $0,8115 \pm 0,0133$ e HG anti-miR-31: $0,7397 \pm 0,0205$) (Figura 32).

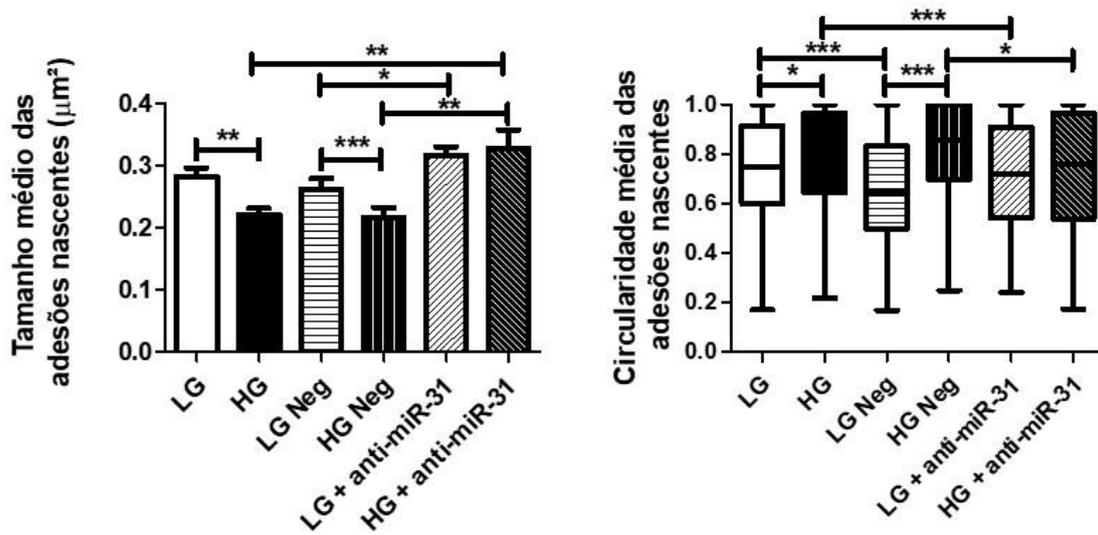


Figura 32. A supressão de miR-31 aumenta o tamanho e reduz a circularidade das adesões nascentes em células NIH-3T3, independentemente da concentração de glicose. Células NIH-3T3 cultivadas em condições normoglicêmicas (LG) ou hiperglicêmicas (HG) foram co-transfectadas com sequências sintéticas inibidoras (anti-miR-31-5p) e paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados (tamanho e circularidade de adesões) foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. Foram analisadas apenas adesões nascentes/complexos focais, $\leq 1 \mu\text{m}^2$. LG: células mantidas em meio controle (glicose 5 mM); HG: células mantidas em meio com elevada concentração de glicose (30 mM); LG Neg: células mantidas em meio LG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; HG Neg: células mantidas em meio HG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; LG anti-miR-31: células mantidas em meio LG e transfectadas com anti-miR-31; HG anti-miR-31: células mantidas em meio HG e transfectadas com anti-miR-31. Resultado obtido de dois experimentos independentes, apresentados como média \pm EPM. Diferenças significativas: * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$; *** $P > 0,0001$, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

As adesões focais ($\geq 1 \mu\text{m}^2$) também apresentaram aumento do tamanho após inibição do miR-31 em células em HG em comparação aos seus respectivos controles (HG: $1,353 \pm 0,0919 \mu\text{m}^2$; HG Neg: $1,600 \pm 0,1100 \mu\text{m}^2$; HG anti-miR-31: $2,953 \pm 0,2400 \mu\text{m}^2$), mas o mesmo efeito não foi observado para células em LG em comparação aos controles LG e LG Neg (LG: $2,010 \pm 0,1252 \mu\text{m}^2$; LG Neg: $2,146 \pm 0,1913 \mu\text{m}^2$; LG + anti-miR-31: $2,321 \pm 0,1468 \mu\text{m}^2$ (Figura 33)). A inibição do miR-31 também reduziu a circularidade das adesões maduras em células em HG, indicando que estas se tornaram mais alongadas em relação aos grupos controle, se efeitos relevantes em células em LG (LG: $0,4867 \pm 0,0189$; LG Neg: $0,3678 \pm 0,0184$; LG + anti-miR-31: $0,3817 \pm 0,0179$; HG: $0,4834 \pm 0,0301$; HG Neg: $0,5880 \pm 0,0416$; HG anti-miR-31: $0,4349 \pm 0,0225$) (Figura 33).

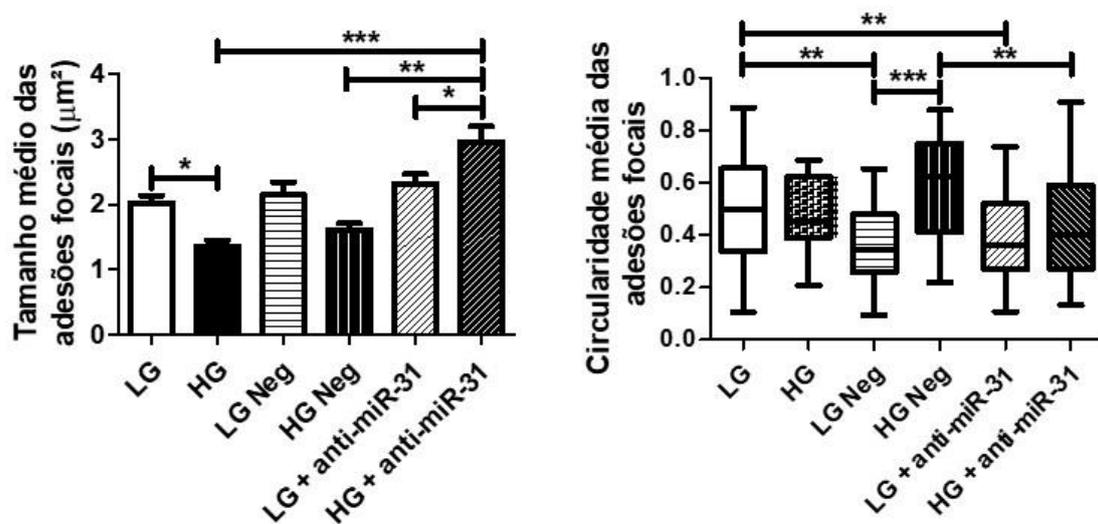


Figura 33. A supressão de miR-31 aumenta o tamanho e reduz a circularidade das adesões focais em células NIH-3T3 expostas a uma concentração elevada de glicose. Células NIH-3T3 cultivadas em condições normoglicêmicas (LG) ou hiperglicêmicas (HG) foram co-transfectadas com sequências sintéticas inibidoras (anti-miR-31-5p) e paxillin-pEGFP, conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados (tamanho e circularidade de adesões) foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. Foram analisadas apenas adesões focais, $\geq 1 \mu\text{m}^2$. LG: células mantidas em meio controle (glicose 5 mM); HG: células mantidas em meio com elevada concentração de glicose (30 mM); LG Neg: células mantidas em meio LG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; HG Neg: células mantidas em meio HG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; LG anti-miR-31: células mantidas em meio LG e transfectadas com anti-miR-31; HG anti-miR-31: células mantidas em meio HG e transfectadas com anti-miR-31. Resultado obtido de dois experimentos independentes, apresentados como média \pm EPM. Diferenças significativas: * $P > 0,05$; ** $P > 0,01$; *** $P > 0,0001$, de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

As imagens obtidas neste experimento mostram que as células dos grupos controles em LG (LG e LG Neg) exibem mais adesões maduras no limite anterior da célula, bem como na região da cauda. Poucas adesões focais foram observadas no corpo da célula. A inibição do miR-31 não resultou em efeitos significativos nas adesões focais em células cultivadas sob condição normoglicêmica (Figura 34). Em células cultivadas na condição hiperglicêmica, no entanto, a inibição do miR-31 aumentou o tamanho e alongamento das adesões focais (Figura 34).

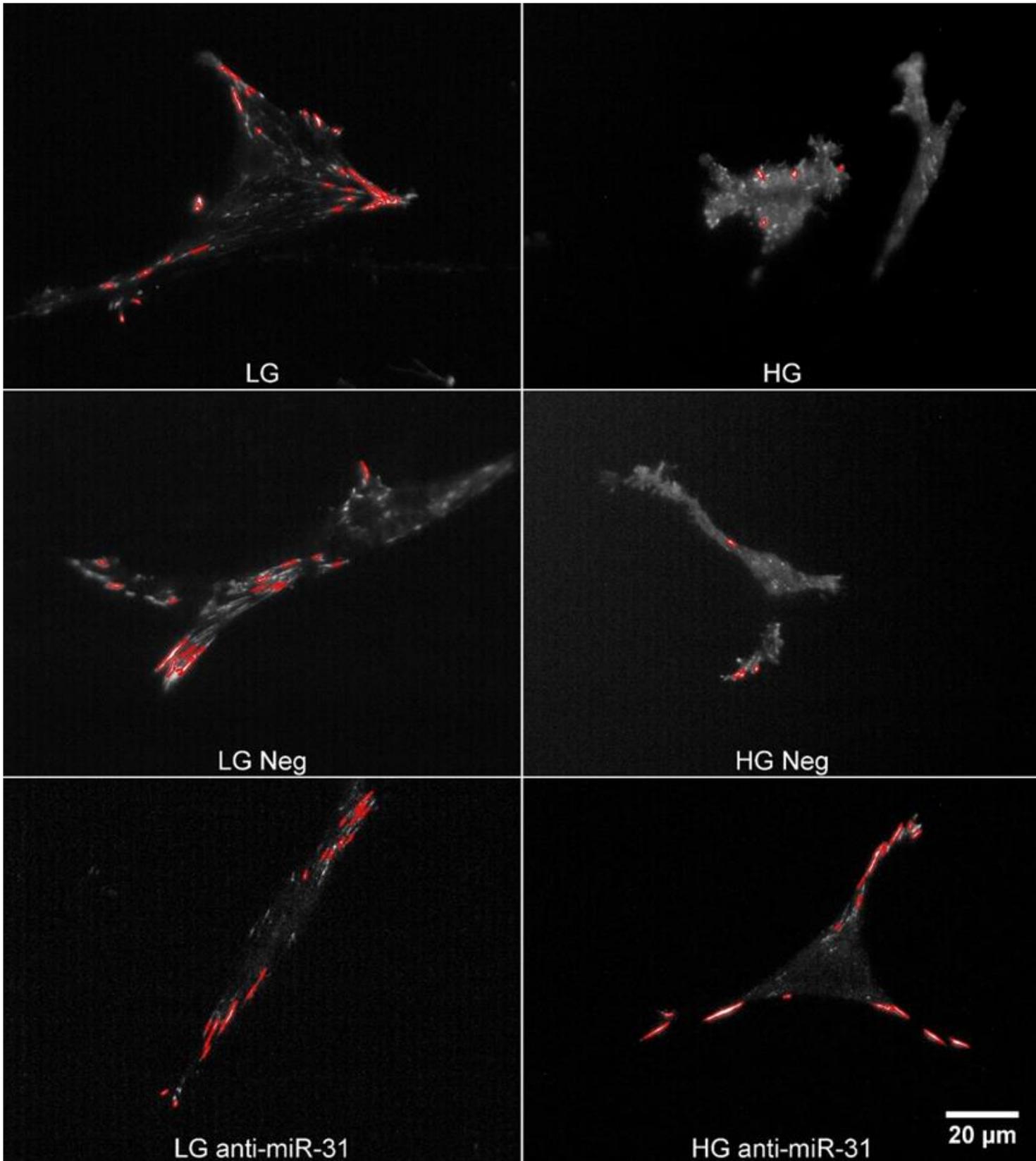


Figura 34. A supressão de miR-31 aumenta o tamanho e reduz a circularidade das adesões focais em células NIH-3T3 expostas a uma concentração elevada de glicose. Células NIH-3T3 cultivadas em condições normoglicêmicas (LG) ou hiperglicêmicas (HG) foram co-transfectadas com sequências sintéticas inibidoras (anti-miR-31-5p) e paxillin-pEGFP,

conforme descrito em Métodos. As adesões celulares foram avaliadas por microscopia TIRF, e os parâmetros analisados (tamanho e circularidade de adesões) foram obtidos através do plugin *Trainable Weka segmentation* – Fiji. Foram analisadas apenas adesões focais, $\geq 1 \mu\text{m}^2$, ressaltadas em vermelho. LG: células mantidas em meio controle (glicose 5 mM); HG: células mantidas em meio com elevada concentração de glicose (30 mM); LG Neg: células mantidas em meio LG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; HG Neg: células mantidas em meio HG e transfectadas com controle negativo para anti-miR; LG anti-miR-31: células mantidas em meio LG e transfectadas com anti-miR-31; HG anti-miR-31: células mantidas em meio HG e transfectadas com anti-miR-31. Resultado obtido de dois experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

O diabetes mellitus é uma desordem metabólica complexa, em que a hiperglicemia pode prejudicar importantes processos fisiológicos e gerar complicações relevantes de longo prazo. A cicatrização, por exemplo, pode ser profundamente prejudicada devido a disfunções teciduais (p.ex. alterações das funções celulares e do microambiente), acompanhadas por alterações na microvasculatura, alterações na resposta inflamatória e neuropatia, favorecendo assim a formação de feridas crônicas (Falanga, 2005; Guo & DiPietro, 2010).

A cicatrização fisiológica de feridas ocorre sequencialmente, e o sucesso de cada fase depende da resolução adequada da fase anterior: fase de hemostasia, fase inflamatória, fase proliferativa (com reepitelialização, no caso da pele e mucosas) e fase de remodelação. Essas fases se superpõem parcialmente e todas envolvem diferentes tipos celulares, assim como a ativação de diversas vias de sinalização de maneira coordenada, visando o reparo tecidual. Sabe-se que o aumento na captação e metabolismo da glicose pelas células envolvidas no processo cicatricial prejudica a cicatrização, contribuindo para a formação de feridas crônicas e de difícil tratamento (Gurtner et al., 2008, Lerman et al., 2003).

Em estudos anteriores do grupo, observou-se que a condição de glicose elevada (*in vitro* ou em ratos com diabetes mellitus tipo I) prejudica a migração de fibroblastos e outros tipos celulares sobre matriz de fibronectina e de colágeno tipo I, causando uma redução da velocidade celular e perda da direcionalidade (Lamers et al., 2011; Almeida et al., 2016). Nesta condição, observou-se um aumento no número de protrusões simultâneas e em diferentes direções, com conseqüente redução da polaridade celular. Em células CHO-K1, Lamers et al. (2011) observaram um aumento da atividade da GTPase Rac1, que estimula a formação de lamelipódios. Adicionalmente, a retração constante dos lamelipódios, devido a uma deficiência na maturação das adesões junto à fibronectina, fazia com que essas protrusões celulares se tornassem improdutivas, impossibilitando a formação de junções maduras (adesões focais) que pudessem servir às células como pontos de ancoragem durante a migração. Estes efeitos relacionados à atividade de Rac1, inclusive a menor maturação das adesões, foram causados pela maior formação de EROs e

consequente estresse oxidativo, sendo revertidos com a presença do antioxidante NAC. Almeida et al. (2016) observaram que fibroblastos dérmicos derivados de ratos diabéticos, que também apresentavam protrusões improdutivas, tinham redução da expressão da subunidade $\alpha 5$ de integrinas, presentes em receptores para fibronectina, como $\alpha 5\beta 1$; a menor expressão de receptores poderia contribuir para a maturação deficiente das adesões.

Os resultados relativos às alterações da migração celular foram confirmados em estudo posterior utilizando fibroblastos embrionários murinos (células NIH-3T3) semeados sobre fibronectina (Gomes, 2015). A exposição a uma concentração elevada de glicose (30 mM) durante 3 dias provocou redução na velocidade de migração, menor direcionalidade e aumento na formação de protrusões não efetivas e simultâneas, de forma dependente de EROs, uma vez que estes efeitos foram prevenidos pela presença de NAC no meio de cultura. Naquele estudo, foi também avaliado o possível papel do microRNA miR-31 no fenótipo migratório e sua regulação pela glicose.

MicroRNAs (miRNAs) são importantes reguladores de processos celulares, por potencialmente interferirem em diferentes vias de sinalização de forma simultânea, por meio do silenciamento de seus RNAs alvos. São também importantes reguladores da migração celular, podendo ter como alvos GTPases da família Rho, seus efetores e seus reguladores (GEFs e GAPs), por exemplo, bem como integrinas e outras proteínas importantes para a adesão da célula à matriz extracelular (Chen et al., 2013; Jiang et al., 2010; Liu et al., 2010, 2012).

No estudo já mencionado, verificou-se que a expressão de miR-31 estava aumentada em cerca de 3 vezes em fibroblastos dérmicos derivados de ratos diabéticos, em comparação a ratos normoglicêmicos. A exposição de células NIH-3T3 a uma concentração elevada de glicose por 3 dias, por sua vez, aumentou a expressão de miR-31 em cerca de 50%. Esse efeito sobre a expressão de miR-31 era dependente de EROs, sendo revertido na presença de NAC (Gomes, 2015).

O miR-31 tem sido relacionado a diferentes complicações do diabetes mellitus de longo prazo, inclusive à cicatrização deficiente de feridas. Sabe-se que os níveis de miR-31 variam conforme os estágios do processo cicatricial fisiológico em humanos, com expressão aumentada durante as fases inflamatória e proliferativa,

tanto na derme quanto na epiderme (Li et al., 2015). Sebastiani et al. (2013) observaram a superexpressão deste miRNA no soro de pacientes com T2DM que apresentavam complicações microvasculares. Além disso, o miR-31 estava super expresso também na retina de ratos com diabetes do tipo 1, sugerindo um papel deste miRNA na patogênese da retinopatia diabética (Kovacs et al.; 2011).

Demonstramos previamente que a superexpressão de miR-31 (utilizando o mimic do miR-31) em fibroblastos NIH-3T3 migrando sobre fibronectina promoveu a formação de múltiplas protrusões não produtivas, simultâneas e em diferentes direções, assim como redução da direcionalidade, sem efeitos sobre a velocidade celular (Gomes, 2015). É possível, portanto, que o miR-31 seja um mediador entre a geração de EROs aumentada pela metabolização da glicose e a regulação das GTPases Rho sobre o citoesqueleto durante a adesão e migração.

Para analisar se o fenótipo migratório observado em células NIH-3T3 expostas à glicose elevada (HG) tem relação direta com a superexpressão de miR-31, buscamos, em bases de dados de bioinformática, encontrar alvos potenciais para o miR-31-5p potencialmente relacionados à adesão e migração celular. Desta forma, foram encontradas as proteínas ROCK 1 e ROCK 2, Radixina (RDX) e as subunidades de integrina $\alpha 5$ e αv como alvos preditos do miR-31 (Gomes, 2015).

As proteínas ROCK 1 e ROCK 2 são efetoras da GTPase Rho propriamente dita (isoformas A, B e C), sendo a isoforma RhoA a melhor conhecida e mais amplamente distribuída (Bishop & Hall, 2000). A superexpressão da proteína RhoA em fibroblastos aumenta o número de adesões focais (maduras) e a formação de fibras de estresse, frequentemente inseridas nestas adesões (Hall, 1998). Este efeito de RhoA se dá principalmente por meio de ROCK 1 e ROCK 2. As ROCKs são cinases que fosforilam diretamente a cadeia leve de miosina II, além de inibir a fosfatase da cadeia leve, também por meio da fosforilação. Sendo assim, o resultado de sua atividade é um aumento da contratilidade celular e do amadurecimento das adesões. A proteína Radixina (RDX) é também uma efetora de RhoA, sendo um componente da família de proteínas ERM (Ezrina, Radixina e Moesina). Sabe-se que é uma proteína adaptadora, unindo o citoesqueleto de actina cortical a receptores na membrana da célula e, portanto, participando na organização do córtex celular (Bretscher, 1999; McClatchey, 2014).

No presente estudo, avaliamos os efeitos da exposição a uma concentração elevada de glicose durante 3 dias sobre a expressão destes potenciais efetores de miR-31 em fibroblastos NIH-3T3. Houve redução da expressão proteica de ROCK 1 e RDX, sem alterações nos níveis proteicos de ROCK 2 e da integrina $\alpha 5$. Observamos também que o uso do antioxidante NAC preveniu tal efeito sobre a expressão destas proteínas, assim como foi observado anteriormente para a expressão do miR-31. A não alteração da expressão de integrina $\alpha 5$ difere da observação feita anteriormente por Almeida et al. (2016), que utilizaram fibroblastos dérmicos de ratos adultos diabéticos, e pode estar relacionada tanto a uma diferença fenotípica entre as células utilizadas nos dois estudos quanto ao tempo de exposição, já que no estudo de Almeida et al. (2016) os ratos estavam diabéticos há 30 dias e no presente estudo, a exposição dos fibroblastos da linhagem NiH-3T3 foi de apenas 3 dias.

Experimentos funcionais de superexpressão e supressão de miR-31 foram, então, empregados para estudar a expressão dos alvos selecionados. Enquanto a superexpressão de miR-31 reduziu a expressão proteica de ROCK 1, ROCK 2 e RDX, sem alterar a expressão da integrina $\alpha 5$, o contrário foi observado após a supressão de miR-31 com relação a ROCK 1, ROCK 2 e RDX (a integrina $\alpha 5$ já não foi avaliada). Estes resultados reforçaram a hipótese de que o miR-31 poderia, por meio da regulação negativa de seus alvos, afetar a migração de células expostas à concentração elevada de glicose.

Foram realizados ensaios de luciferase com o intuito de demonstrar a capacidade do miR-31 de ligar-se diretamente à região 3'UTR do RNAm das proteínas de interesse ROCK 1 e RDX (ROCK 2 foi excluída pelo fato de sua expressão não ter sido regulada pela glicose). Os resultados mostraram que apenas o RNAm de RDX poderia sofrer essa regulação pelo miR-31, sugerindo que ROCK 1 seja regulado pelo miR-31 de forma indireta, por mecanismos ainda não esclarecidos. É importante ressaltar que apenas um dos sítios potenciais de interação do RNAm de RDX foi testado neste estudo; há, ainda, um outro sítio predito na região 3'UTR de RDX para interação com o miR-31, que não foi avaliado.

A proteína RDX foi validada como alvo direto do miR-31 por Hua et al. (2012), em células de glioblastoma humano. Naquele estudo, a expressão reduzida de miR-31 aumentava a expressão de RDX, fato relacionado com a maior migração e invasividade tumoral. A superexpressão de miR-31 e conseqüente silenciamento de

RDX reduziu a capacidade de migração e invasão das células tumorais. Em um outro estudo, a inibição da expressão de RDX em células PC3 (câncer de próstata) por meio de siRNA promoveu indiretamente a ativação da GTPase Rac1 por GEFs pertencentes à família Vav, promovendo maior espreadimento celular, afetando a migração e a organização do citoesqueleto de actina (Valderrama et al., 2012).

Embora o papel das proteínas ERM na migração celular não esteja ainda bem esclarecido, um estudo conduzido por Mackay et al. (1997) em fibroblastos permeabilizados com digitonina e na presença de GTP γ S (guanosina 5'-O-3-thiotrifosfato) e utilizando ERM recombinantes mostrou que estas proteínas são fundamentais para a montagem das fibras de estresse, a polimerização da actina cortical e a formação de adesões em resposta à ativação de RhoA e Rac1. No presente estudo, o papel do miR-31 na dinâmica das adesões junto à fibronectina sugere que a RDX possa exercer um papel relevante.

Com relação às isoformas de ROCK, não existem muitos estudos diferenciando o papel de cada uma sobre diferentes processos celulares. Mertsch e Thanos (2014), verificaram que a inibição de ambas por siRNA em células de glioma aumentou a formação de processos celulares simultâneos, acompanhada da redução na formação de fibras de estresse e aumento da capacidade migratória. A contratilidade celular mediada pela atividade de ROCKs é importante também para a retração da parte posterior da célula, evento necessário para a propulsão do corpo celular na direção da migração. Fibroblastos tratados com Y-27632 (inibidor de ROCKs) apresentaram caudas alongadas devido à dificuldade na retração da parte posterior e também perda de adesões focais, sugerindo um papel de ROCKs nas adesões mediadas por ativação de RhoA (Kato et al., 2001). Mais recentemente, Newell-Litwa et al. (2015) demonstraram que as duas isoformas de ROCK regulam vias moleculares distintas, e que a atividade coordenada de ambas é responsável pelo estabelecimento da polaridade na migração celular e regulação da maturação das adesões. O estudo demonstrou que, em fibroblastos, ROCK 1, por meio da promoção da formação de fibras de estresse, participa do estabelecimento da polaridade inicial na migração, enquanto a força contrátil gerada por ROCK 2 é relevante na retração na parte posterior das células. Com relação à maturação das adesões, observou-se que ambas as isoformas são importantes; ROCK 2, por meio da fosforilação e inibição de cofilina na região do lamelipódio, regula negativamente a atividade de Rac1, favorecendo o

amadurecimento das adesões, também com a contribuição de ROCK 1. No presente estudo, a supressão de miR-31 aumentou a área celular e a quantidade de fibras de estresse, o que é compatível com um aumento da atividade de ROCK 1 e ROCK 2. Também promoveu um significativo aumento na maturação das adesões, que será discutido mais adiante.

Conforme já mencionado, a determinação de um lamelipódio prevalente e maturação das adesões na região dianteira da célula é fundamental para o estabelecimento da polaridade celular e da direcionalidade da migração. A maturação das adesões é importante também para a retração do corpo celular, produzindo o movimento migratório, já que as adesões maduras servem como pontos de ancoragem das células junto à matriz extracelular, sendo locais onde se inserem fibras de estresse intracelulares. Todos esses processos são regulados por ROCKs (Riento & Ridley, 2003), e o papel de miR-31 na regulação destas proteínas, particularmente ROCK 1, mesmo que indireto, é muito relevante para o esclarecimento do fenótipo migratório dos fibroblastos perante a glicose elevada.

Os resultados obtidos por microscopia TIRF mostraram que células NIH-3T3 expostas à HG e transfectadas com paxilina fluorescente exibiram menor número de adesões. As adesões presentes eram menores e mais circulares, indicando adesões imaturas, como as adesões nascentes e complexos focais (complexos intermediários entre adesões nascentes e adesões maduras). Este efeito da HG não foi observado na presença de NAC. Estes resultados corroboram as observações de Lamers et al. (2011) em células CHO-K1.

Experimentos funcionais utilizando miR mimic e anti-miR para manipular a expressão de miR-31 mostraram que a superexpressão de miR-31 em células controle impediu a maturação das adesões. Não foram observadas adesões focais (maduras), e as adesões nascentes observadas apresentavam menor tamanho e maior circularidade que aquelas observadas nas células não transfectadas, ou transfectadas com miR controle. Esse efeito se assemelha aos efeitos da HG, mas foram mais drásticos, compatíveis com uma expressão bem maior de miR-31 que aquela promovida pela glicose em células NIH-3T3.

Previamente, havíamos observado que a superexpressão do miR-31 não alterou a velocidade celular, mas prejudicou a direcionalidade e promoveu a formação

de protrusões múltiplas, sem um lamelipódio predominante. Nesse sentido, os efeitos do miR-31 superexpresso são compatíveis com uma redução de ROCK 1, ROCK 2 e RDX e consequente redução da maturação das adesões. As projeções simultâneas, dependentes da atividade de Rac1, são compatíveis com a redução da expressão de ROCK 2, devido ao seu papel regulatório negativo sobre cofilina e Rac1 na região do lamelipódio (Newell-Litwa et al. (2015)). São também compatíveis com a redução da expressão de RDX, que indiretamente regula a atividade de Rac1 via GEFs da família Vav (Valderrama et al., 2012).

A supressão do miR-31, em condição normoglicêmica, não alterou a proporção entre adesões nascentes/complexos focais (imaturas) e adesões focais (maduras), nem o tamanho médio das adesões. No entanto, o tamanho das adesões nascentes aumentou e sua circularidade foi reduzida, sugerindo uma maior tendência à maturação. Já nas células em condição hiperglicêmica, o anti-miR-31 aumentou significativamente a quantidade de adesões maduras em relação às adesões nascentes. Além disso, o tamanho médio das adesões foi bastante aumentado e sua circularidade foi reduzida; o mesmo efeito foi observado tanto nas adesões nascentes quanto nas adesões focais, quando analisadas separadamente. Esses resultados demonstram um papel muito relevante do miR-31 na dinâmica das adesões: na sua ausência, as proteínas ROCK 1 e ROCK 2 estão elevadas, e podem livremente exercer seu papel na maturação de adesões, conforme sugerido pelos resultados. Quanto à proteína RDX, considerando-se que o aumento de sua expressão poderia indiretamente reduzir a atividade de Rac1 no lamelipódio (Valderrama et al., 2012), papel compartilhado com ROCK 2, é coerente que na sua presença as adesões mais maduras, promovidas por RhoA e desfavorecidas por Rac1, estejam mais evidentes.

Nos experimentos de migração, a supressão do miR-31 reduziu a velocidade celular em células controle e também naquelas expostas à glicose elevada, e aumentou a direcionalidade de migração apenas em células controle. Houve maior estabilidade das protrusões formadas em células cultivadas em meio com concentração elevada de glicose. Esses resultados são compatíveis com uma maior maturação das adesões, o que confere às protrusões maior estabilidade e menor taxa de retração. A contratilidade celular, aumentada com a supressão de miR-31, não determina a formação de adesões nascentes no limite anterior do lamelipódio, mas é fundamental para sua maturação, alongamento e crescimento, formando adesões

focais. O processo de maturação, portanto, tem origem em uma zona mais posterior do lamelipódio e ocorre ao longo de finos feixes de actina, que se agrupam de forma dependente da atividade de miosina II (Choi et al., 2008).

Quanto à velocidade celular, provavelmente sua redução promovida pelo anti-miR-31 está relacionada à maior maturação de adesões e maior contratilidade das células, já que foram observadas mais fibras de estresse. A menor retração das protrusões de membrana certamente contribuiu para um aumento na persistência direcional da migração, e células mais aderidas à matriz tendem a migrar mais lentamente. Yang et al. (2007) demonstraram que células B16F1 transfectadas com a formina mDIA2 constitutivamente ativa apresentaram menor velocidade de protrusão e maior persistência do lamelipódio. Forminas são efetores de RhoA que atuam na nucleação e formação de filamentos de actina, e mDIA2 é uma formina fosforilada e ativada por ROCK 1, contribuindo para a formação de feixes de filamentos de actina (Staus et al., 2011).

Os resultados apresentados no presente estudo sugerem que somente a supressão do miR-31 nos fibroblastos NIH-3T3 mantidos em meio HG não é suficiente para reestabelecer o fenótipo migratório destas células. Este fato é esperado, uma vez que a manutenção das células em meio com glicose elevada pode causar o desequilíbrio dos processos celulares por diferentes vias, através de inúmeros fatores, bem como o desbalanço de inúmeros miRNAs. Assim sendo, com este experimento não visamos restabelecer o fenótipo migratório por completo, mas elucidar os mecanismos pelos quais o miR-31 modula a migração celular.

Em células expostas a uma concentração elevada de glicose, embora esteja clara a relação entre geração de EROs devido à maior metabolização da glicose, aumento da expressão de miR-31 com consequente redução da expressão de seus alvos (diretos ou indiretos) e alterações no fenótipo migratório, não foi explorado neste estudo o mecanismo por meio do qual os EROs poderiam modular diretamente a migração ou a expressão gênica.

Estudos recentes sugerem que existem dois mecanismos paralelos para a ativação das GTPases Rho: a via clássica por reguladores GEFs/GAPs e a ativação mediada pela oxidação pós-traducional das proteínas; o estado redox intracelular determinaria qual via de ativação é prevalente (Heo e Campbell, 2005). Aghajanian et

al. (2009) demonstraram a possibilidade de EROs e ERNs serem reguladores pós-traducionais de GTPases da família Rho. RhoA, Rac1 e Cdc42 possuem um sítio conservado susceptível à oxidação reversível que, quando em condição intracelular redutora, causa a troca de nucleotídeos e a ativação da GTPase (Heo e Campbell; 2005). *In vivo*, foi demonstrado que por meio da mutação das cisteínas Cys16 e Cys20, houve a inibição da ativação de RhoA por H₂O₂ e inibição da formação de fibras de estresse, sem interferir na sua capacidade de ativação por GEFs (Aghajanian et al.; 2009). Sendo assim, é possível que, além da regulação de miRNAs, o estado redox alterado na célula em condição hiperglicêmica leve à ativação de GTPases.

O mecanismo pelo qual a glicose elevada foi capaz de aumentar a expressão do miR-31 ainda não foi elucidado. Entretanto, sabe-se atualmente que a hiperglicemia é capaz de modular a expressão gênica por meio de mecanismos epigenéticos, ao que se relaciona à denominada “memória metabólica” (Intine & Sarras, 2013; Kato & Natarajan, 2019). Em câncer de mama, a redução na expressão do miR-31 foi relacionada ao aumento do potencial metastático. Augoff et al. (2012) mostraram que, nas linhagens celulares de câncer de mama analisadas, o promotor do gene no qual o miR-31 está localizado encontrava-se hipermetilado. Em presença de um agente demetilante e em combinação com um agente deacetilante, houve aumento na expressão deste miRNA. Esta seria uma investigação interessante para fibroblastos expostos à glicose elevada, já que é possível que a glicose aumente a expressão de miR-31 em fibroblastos através de mecanismos epigenéticos, contribuindo para os efeitos observados na migração celular.

6 CONCLUSÃO

A exposição de fibroblastos à glicose elevada, por mecanismos relacionados ao estresse oxidativo, aumenta a expressão do miR-31. A redução na expressão proteica de seus alvos Radixina (alvo direto) e ROCK 1 (alvo indireto) prejudica a migração principalmente por meio da diminuição da capacidade de maturação de adesões celulares junto à matriz extracelular, causando uma perda na estabilidade dos lamelipódios e diminuição da persistência direcional da migração, além de reduzir a contratilidade celular. Entretanto, este miRNA não está relacionado a todas as limitações da migração celular frente à glicose elevada, e sua inibição isoladamente não é suficiente para restaurar o fenótipo migratório nestas condições. Apesar disso, os dados apresentados contribuem para a compreensão dos fenômenos envolvidos no processo de migração celular e podem, no futuro, contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de feridas crônicas em condição hiperglicêmica.

Referências *

AGHAJANIAN, A.; WITTCHEM, E.S.; CAMPBELL, S.L.; BURRIDGE, K. Direct activation of RhoA by reactive oxygen species requires a redox-sensitive motif. **PLoS ONE**. 4, e8045, 2009.

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

ALDINI, G.; ALTOMARE A.; BARON, G.; VISTOLI, G.; CARINI, M; BORSANI, L.; SERGIO F. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why, **Free Radical Research**, 52:7, 751-762, 2018.

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

ALMEIDA, M.E.S. Papel da glicação do colágeno I e da alta concentração de glicose sobre a migração de fibroblastos. Tese de Doutorado (Biologia Celular e Tecidual). Programa de Biologia Celular e Tecidual, Instituto de Ciências Biomédicas da USP. 2011.

AMANO, M.; NAKAYAMA, M.; KAIBUCHI, K. Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity. **Cytoskeleton**, 67(9): 545–554, 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. 32(Suppl 1): S62–S67, 2009.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 6(6):593-7, 1989.

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**. 24(5):547-553. 2016.

ATKINSON, M.A.; MACLAREN, N.K. The Pathogenesis of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **N. Engl. J. Med.**, 331:1428-1436, 1994.

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

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

BAINBRIDGE, P. Wound healing and the role of fibroblasts. **Journal of Wound Care**, 22(8), 407–412, 2013.

BANERJEE, J.; CHAN, Y.C.; SEN, C.K. MicroRNAs in skin and wound healing. **Physiological Genomics**, 43(10):543-56, 2011.

BAUM, C.L.; ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic Surgery**, 31(6):674-86; discussion 686, 2005.

BIRBEN, E.; SAHINER, U.M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, 5(1):9-19, 2012.

BISHOP, A.L.; HALL, A. Rho GTPases and their effector proteins. **The Biochemical Journal.**, 348(Pt 2): 241–255, 2000.

BONORA, M.; PATERGNANI, S.; RIMESSI, A.; DE MARCHI, E.; SUSKI J.M.; BONONI, A.; GIORGI, C.; MARCHI, S.; MISSIROLI, S.; POLETTI, F.; WIECKOWSKI, M.R.; PINTON, P. ATP synthesis and storage. **Purinergic Signalling**, 8(3): 343–357, 2012.

BRETSCHER, A. Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. **Curr Opin Cell Biol.**, 11(1):109-16, 1999.

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

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**., 54(6):1615-25, 2005.

CAI, Y.; YU, X.; HU, S.; YU, J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. **Genomics Proteomics Bioinformatics**., 7(4):147-54, 2009.

CANO SANCHEZ, M.; LANCEL, S.; BOULANGER, E.; NEVIERE, R. Targeting Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in the Treatment of Impaired Wound Healing: A Systematic Review. **Antioxidants**, 7(8), 2018.

CERIELLO, A.; TESTA, R.; GENOVESE, S. Clinical implications of oxidative stress and potential role of natural antioxidants in diabetic vascular complications. **Nutrition, Metabolism and Cardiovasc Diseases**.; 26(4):285-92, 2016.

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

CHEN, Y.; AZAD, M.B.; GIBSON, S.B. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. **Cell Death and Differentiation**., 16(7):1040-52, 2009.

CHEN, Z.; SHENTU, T.P.; WEN, L.; JOHNSON, D.A.; SHYY, J.Y.J. Regulation of SIRT1 by Oxidative Stress-Responsive miRNAs and a Systematic Approach to Identify Its Role in the Endothelium. **Antioxid. Redox. Signal.**, v.19, n.13, p.1522–1538. 2013.

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

CHOI, C.K.; VICENTE-MANZANARES, M.; ZARENO, J.; WHITMORE, L.A.; MOGILNER, A.; HORWITZ, A.R. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. **Nat Cell Biol.**, 10(9):1039-50, 2008.

CROFT, D.R.; OLSON, M.F. Transcriptional regulation of Rho GTPase signaling. **Transcription.**, 2(5): 211–215, 2011.

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

DJEBALI, S.; DAVIS, C.A.; MERKEL, A.; DOBIN, A.; LASSMANN, T.; MORTAZAVI, A.; TANZER, A.; LAGARDE, J.; LIN, W.; SCHLESINGER, F.; XUE, C.; MARINOV, G.K.; KHATUN, J.; WILLIAMS, B.A.; ZALESKI, C.; ROZOWSKY, J.; RÖDER, M.; KOKOCINSKI, F.; ABDELHAMID, R.F.; ALIOTO, T.; ANTOSHECHKIN, I. Landscape of transcription in human cells. **Nature.**, 489(7414):101-8, 2012.

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

DUNNILL, C.; PATTON, T.; BRENNAN, J.; BARRETT, J.; DRYDEN, M.; COOKE, J.; LEAPER, D.; GEORGOPOULOS, N.T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. **International Wound Journal.**, 14(1):89-96, 2017.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F.J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nature Reviews Cancer.**, 6(4):259-69, 2006.

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

FAHS, F.; BI, X.; YU, F.S.; ZHOU, L.; MI, Q.S. New insights into microRNAs in skin wound healing. **IUBMB Life.**, 67(12):889-96, 2015.

FALANGA, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **The Lancet.**, v. 366, 9498, p. 1736-1743, 2005.

GEBERT, L. F. R.; MACRAE, I. J. (2018). Regulation of microRNA function in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2018.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research.**, 107(9):1058-70, 2010.

GOLBIDI, S.; EBADI, S.A.; LAHER, I. Antioxidants in the treatment of diabetes. **Current Diabetes Reviews.**, 7(2):106-25, 2011.

GOMES, C.C. Efeitos da elevada concentração de glicose sobre a expressão de MIR-31 em fibroblastos. Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e Tecidual). Programa de Biologia Celular e Tecidual, Instituto de Ciências Biomédicas da USP. 2015.

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

GREGORY, R.I.; SHIEKHATTAR, R. MicroRNA biogenesis and cancer. **Cancer Research.**, 65(9):3509-12, 2005.

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

GUO, S.; L.A. DIPIETRO. Factors Affecting Wound Healing. **Journal of Dental Research.** 89(3): 219–229, 2010.

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

HALL, A. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. **Science**, 279(5350), 509–514, 1998.

HASHIMOTO, N.; TANAKA, T. Role of miRNAs in the pathogenesis and susceptibility of diabetes mellitus. **Journal of Human Genetics.** 62(2):141-150., 2017.

HE, Y.; HUANG, C.; ZHANG, S.P.; SUN, X.; LONG, X.R.; LI, J. The potential of microRNAs in liver fibrosis. **Cellular Signalling**. 24(12):2268-72, 2012.

HEO, J.; CAMPBELL, S.L. Mechanism of redox-mediated guanine nucleotide exchange on redox-active Rho GTPases. **J. Biol. Chem.** 280, 31003-31010, 2005.

HIEBERT, P.; WERNER, S. MicroRNA therapy for infected wounds. **EMBO Molecular Medicine**. 10(10): e9574, 2018.

HODGE, R.G.; RIDLEY, A.J. Regulating Rho GTPases and their regulators. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**., 17(8):496-510, 2016.

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

HUA, D.; DING, D.; HAN, X.; ZHANG, W.; ZHAO, N.; FOLTZ, G.; LAN, Q.; HUANG, Q.; LIN, B. Human miR-31 targets radixin and inhibits migration and invasion of glioma cells. **Oncology Reports**. 27(3):700-6, 2012.

HUANG, S.; HE, X. microRNAs: tiny RNA molecules, huge driving forces to move the cell. **Protein & Cell**. 1(10): 916–926, 2010.

HUIJBERTS, M.S.; SCHAPER, N.C.; SCHALKWIJK, C.G. Advanced glycation end products and diabetic foot disease. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**., 24 Suppl 1: S19-24, 2008.

HUTTENLOCHER, A.; HORWITZ, A.R. Integrins in Cell Migration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. 3(9): a005074, 2011.

IBRAHIM, S.A.; HASSAN, H.; GÖTTE, M. MicroRNA-dependent targeting of the extracellular matrix as a mechanism of regulating cell behavior. **Biochimica et Biophysica Acta**., 1840(8):2609-20, 2014.

IGHODARO, O.M.; AKINLOYE, O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v.54, n.4, p.287-293, 2018.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. idf.org. Consulta online em 01/04/2021.

INTINE, R.V.; SARRAS, M.P. Metabolic Memory and Chronic Diabetes Complications: Potential Role for Epigenetic Mechanisms. **Curr Diab Rep.**, 12(5): 551–559, 2012.

JHA, J.C.; BANAL, C.; CHOW, B.S.M; COOPER, M.E.; JANDELEIT-DAHM, K. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signalling.**, 25(12): 657–684, 2016.

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

KAO, Y.Y.; CHOU, C.H.; YEH, L.Y.; CHEN, Y.F.; CHANG, K.W.; LIU, C.J.; LIN, S.C. (2019). MicroRNA miR-31 targets SIRT3 to disrupt mitochondrial activity and increase oxidative stress in oral carcinoma. **Cancer Letters**, 2019.

KATO, M.; NATARAJAN, R. Epigenetics and epigenomics in diabetic kidney disease and metabolic memory. **Nature Reviews Nephrology**, 2019.

KATOH, K.; KANO, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K.; FUJIWARA, K. Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts. **American Journal of Physiology. Cell Physiology.**, 280(6):C1669-79, 2001.

KHODR, B.; KHALIL, Z. Modulation of inflammation by reactive oxygen species: implications for aging and tissue repair. **Free Radical Biology and Medicine.** (1):1-8, 2001.

KIM, V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.**, 6(5):376-85, 2005.

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

KURUTAS, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition Journal.**, 15: 71, 2016.

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

LANDÉN, N.X.; DONGQING, L.I.; STÄHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 73(20): 3861–3885, 2016.

LAWSON, C.D.; RIDLEY, A.J. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. **The Journal of Cell Biology.**, 217(2):447-457, 2018.

LEE, M.H.; KUNDU, J.K.; CHAE, J.I.; SHIM, J.H. Targeting ROCK/LIMK/cofilin signaling pathway in cancer. **Archives of Pharmacal Research.**, 42(6):481-491, 2019.

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

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

LI, Q.; HUI ZHAO, WEIMIN CHEN, PING HUANG, JIARUI BI. Human keratinocyte-derived microvesicle miRNA-21 promotes skin wound healing in diabetic rats through facilitating fibroblast function and angiogenesis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.114, n.105570, 2019.

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

LIU, M.; BI, F.; ZHOU, X.; ZHENG, Y. Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. **Trends in Cell Biology.** 22(7):365-73, 2012.

MACKAY, D. J. G.; ESCH, F.; FURTHMAYR, H.; HALL, A. Rho- and Rac-dependent Assembly of Focal Adhesion Complexes and Actin Filaments in Permeabilized Fibroblasts: An Essential Role for Ezrin/Radixin/Moesin Proteins. **The Journal of Cell Biology**, 138(4), 927–938, 1997.

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

MAEKAWA, M.; ISHIZAKI, T.; BOKU, S.; WATANABE, N.; FUJITA, A.; IWAMATSU, A.; OBINATA, T.; OHASHI, K.; MIZUNO, K.; NARUMIYA, S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. **Science.**, 285(5429):895-8, 1999.

MAGENTA, A.; GRECO, S.; GAETANO, C.; MARTELLI, F. Oxidative Stress and MicroRNAs in Vascular Diseases. **International Journal of Molecular Sciences.**, 14(9): 17319–17346, 2013.

MANGEAT, P.; ROY, C.; MARTIN, M. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. **Trends in Cell Biology**, 9(5):187-92, 1999.

MAO, G.; GOSWAMI, M.; KALEN, A.L.; GOSWAMI, P.C.; SARSOUR, E.H. N-acetyl-L-cysteine increases MnSOD activity and enhances the recruitment of quiescent human fibroblasts to the proliferation cycle during wound healing. **Mol Biol Rep.**, 43(1):31-9, 2016.

MARTINDALE, J.L.; HOLBROOK, N.J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **Journal of Cellular Physiology**. 2002 Jul;192(1):1-15.

MCCLATCHEY, A.I. ERM proteins at a glance. **Journal of Cell Science.**, 127(Pt 15): 3199-204, 2014.

MEMISOĞULLARI, R.; TAYSI, S.; BAKAN, E.; CAPOGLU, I. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus. **Cell Biochemistry and Function**. 21(3):291-6, 2003.

MENG, Z.; ZHOU, D.; GAO, Y.; ZENG, M.; WANG, W. miRNA delivery for skin wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, 129:308-318, 2018.

MERTSCH, S.; THANOS, S. Opposing signaling of ROCK1 and ROCK2 determines the switching of substrate specificity and the mode of migration of glioblastoma cells. **Mol. Neurobiol.** v.49, p. 900–915. 2014.

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

MUECKLER, M.; THORENS, B. The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. **Molecular Aspects of Medicine.** 2013 Apr-Jun; 34(0): 121–138. doi: 10.1016/j.mam.2012.07.001

NAVALE, A.M.; PARANJAPE, A.N. Glucose transporters: physiological and pathological roles. **Biophysical Reviews.**, 8(1): 5–9, 2016.

NEWELL-LITWA, K.A.; BADOUAL, M; ASMUSSEN, H.; PATEL, H.; WHITMORE, L.; HORWITZ, A.R. ROCK1 and 2 differentially regulate actomyosin organization to drive cell and synaptic polarity. **J. Cell. Biol.**, 210(2):225-42, 2015.

NEWSHOLME, P.; CRUZAT, V.F.; KEANE, K.N.; CARLESSI, R.; DE BITTENCOURT, P.I. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. **The Biochemical Journal.**, 473(24):4527-4550, 2016.

NEWSHOLME, P.; KEANE, K.N.; CARLESSI, R.; CRUZAT, V. Oxidative stress pathways in pancreatic β -cells and insulin-sensitive cells and tissues: importance to cell metabolism, function, and dysfunction. **American Journal of Physiology: Cell Physiology.**, 317(3):C420-C433, 2019.

O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; & PENG, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402, Aug 3, 2018.

PATEL, R.P.; MCANDREW, J.; SELLAK, H.; WHITE, C.R.; JO, H.; FREEMAN, B.A.; DARLEY-USMAR, V.M. Biological aspects of reactive nitrogen species. **Biochimica et Biophysica Acta.**, 1411(2-3):385-400, 1999.

PESSOA, A.F.M. A administração sistêmica e tópica de vitaminas antioxidantes acelera a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos. Tese de Doutorado, Programa de Biologia Celular e Tecidual, Instituto de Ciências Biomédicas da USP. 151 p. 2014.

PicTar Web Interface. Disponível em: <[http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar_Vertebrate.cgi](http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar Vertebrate.cgi)>. Acesso em: 13 mar. 2015.

POY, M.N.; ELIASSON, L.; KRUTZFELDT, J.; KUWAJIMA, S.; MA, X.; MACDONALD, P.E.; PFEFFER, S.; TUSCHL, T.; RAJEWSKY, N.; RORSMAN, P.; STOFFEL, M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. **Nature**, 432(7014):226-30, 2004.

RAFTOPOULOU, M.; HALL, A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. **Developmental Biology**, 265(1):23-32, 2004.

RAHIMI, R.; NIKFAR, S.; LARIJANI, B.; ABDOLLAHI, M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 59(7):365-73, 2005.

RIDLEY, A.J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. **Trends in Cell Biology**, 16(10):522-9, 2006.

RIDLEY, A.J. Rho GTPases and cell migration. **Journal of Cell Science**, 114(Pt 15):2713-22, 2001.

RIENTO, K., RIDLEY, A. ROCKs: multifunctional kinases in cell behaviour. **Nat Rev Mol Cell Biol** 4, 446–456, 2003.

ROLO, A.P.; PALMEIRA, C.M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 15;212(2):167-78, 2006.

SAMUNI, Y.; GOLDSTEIN, S.; DEAN, O.M.; BERK, M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochimica et Biophysica Acta.**, 1830(8):4117-29, 2013.

SCHAKS, M.; GIANNONE, G.; ROTTNER, K. Actin dynamics in cell migration. **Essays in Biochemistry.**, 63(5):483-495, 2019.

SCHOFIELD, A.V.; BERNARD, O. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.**, 48(4):301-16, 2013.

SCHULTZ, G.S.; WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, 17(2):153-62, 2009.

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

SENA, L.A.; CHANDEL, N.S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Molecular Cell**, 48(2): 158–167, 2012.

SHARMA, A.; DAVIS, A.; SHEKHAWAT, P.S. Hypoglycemia in the preterm neonate: etiopathogenesis, diagnosis, management and long-term outcomes. **Translational Pediatrics**, 6(4): 335–348, 2017.

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

SINGER, A.J.; CLARK, R.A. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, 341(10):738-46, 1999.

SINGH, V.P.; BALI, A.; SINGH, N.; JAGGI, A.S. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. **The Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, 18(1): 1–14, 2014.

SIVITZ, W.I.; YOREK, M.A. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, 12(4): 537–577, 2010.

SONEJA, A.; DREWS, M.; MALINSKI, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacological Reports**, 57 Suppl:108-19, 2005.

SOSSEY-ALAOUI, K.; DOWNS-KELLY, E.; DAS, M.; IZEM, L.; TUBBS, R.; PLOW, E.R. WAVE3, an actin remodeling protein, is regulated by the metastasis suppressor

microRNA, miR-31, during the invasion-metastasis cascade. **Int. J. Cancer**, v.129, p.1331–1343, 2011.

STAUS, D.P.; TAYLOR, J.M.; MACK, C.P. Enhancement of mDia2 activity by Rho-kinase-dependent phosphorylation of the diaphanous autoregulatory domain. **Biochem J.**, 439(1): 57–65, 2011.

SUN, Z.; LAMBACHER, A.; FÄSSLER, R. Nascent Adhesions: From Fluctuations to a Hierarchical Organization. **Current Biology**, v. 24, n.17, p. R801-R803, 2014.

SZALECZKY, E.; PRECHL, J.; FEHER, J.; SOMOGYI, A. Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus – a rational approach. **Postgraduate Medical Journal**, 75(879): 13–17, 1999.

Target Scan Human – Prediction of microRNA targets. Disponível em: <http://www.targetscan.org/cgi-bin/vert_61/view_gene.cgi?rs=NM_004850&taxid=9606&members=&showcnc=1&shownc=1#miR-31>. Acesso em: 13 de março de 2015.

TOTSUKAWA, G.; YAMAKITA, Y.; YAMASHIRO, S.; HARTSHORNE, D.J.; SASAKI, Y.; MATSUMURA, F. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. **The Journal of Cell Biology**, 150(4):797-806, 2000.

TREIBER, T.; TREIBER, N.; MEISTER, G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2018.

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

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

VESSBY, J.; BASU, S.; MOHSEN, R.; BERNE, C.; VESSBY, B. Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. **Journal of Internal Medicine**, 251(1):69-76, 2002.

VICENTE-MANZANARES, M.; HORWITZ, A.R. Adhesion dynamics at a glance. **Journal of Cell Science**, 124(23): 3923–3927, 2011.

WINK, D.A.; HINES, H.B.; CHENG, R.Y.; SWITZER, C.H.; FLORES-SANTANA, W.; VITEK, M.P.; RIDNOUR, L.A.; COLTON, C.A. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. **Journal of Leukocyte Biology**, 89(6):873-91, 2011.

World Health Organization (WHO). <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/>. Consultado em 11/03/2019.

WOZNIAK, M.A.; MODZELEWSKA, K.; KWONG, L.; KEELY, P.J. Focal adhesion regulation of cell behavior. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1692(2-3):103-19, 2004.

XU, J.; WU, W.; ZHANG, L.; DORSET-MARTIN, W.; MORRIS, M.W.; MITCHELL, M.E.; LIECHTY, K.W. The role of microRNA-146a in the pathogenesis of the diabetic wound-healing impairment: correction with mesenchymal stem cell treatment. **Diabetes**, 61(11):2906-12, 2012.

YANG, C.; CZECH, L.; GERBOTH, S.; KOJIMA, S.; SCITA, G.; SVITKINA, T. Novel Roles of Formin mDia2 in Lamellipodia and Filopodia Formation in Motile Cells. **PLoS Biol.**, 5(11): e317, 2007.

YONEDA, A.; USHAKOV, D.; MULTHAUPT, H.A.B.; COUCHMAN, J.R. Fibronectin matrix assembly requires distinct contributions from Rho Kinases I and II. **Molecular Biology of the Cell**, v.18, p. 66–75. 2007.

ZAIDEL-BAR, R.; COHEN, M.; ADDADI, L.; GEIGER, B. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. **Biochemical Society Transactions**, 32(Pt3):416-20, 2004.

ZAMPETAKI, A.; KIECHL, S.; DROZDOV, I.; WILLEIT, P.; MAYR, U.; PROKOPI, M.; MAYR, A.; WEGER, S.; OBERHOLLENZER, F.; BONORA, E.; SHAH, A.; WILLEIT, J.; MAYR, M. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. **Circulation Research.**, 107, 810–817, 2010.

ZAYED, M. A., WEI, X., PARK, K., BELAYGOROD, L., NAIM, U., HARVEY, J., YIN, L., BLUMER, K., SEMENKOVICH, C. F. N-acetylcysteine accelerates amputation stump healing in the setting of diabetes. **FASEB J.**, 31(6): 2686–2695, 2017.