

**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

## 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.

# 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<sup>+</sup> (*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 CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NADH E FADH<sub>2</sub>.

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 FADH<sub>2</sub> fornecem elétrons para o complexo I (NADH ubiquinona redutase) e para o complexo II (succinato desidrogenase), respectivamente. NADH e FADH<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O.

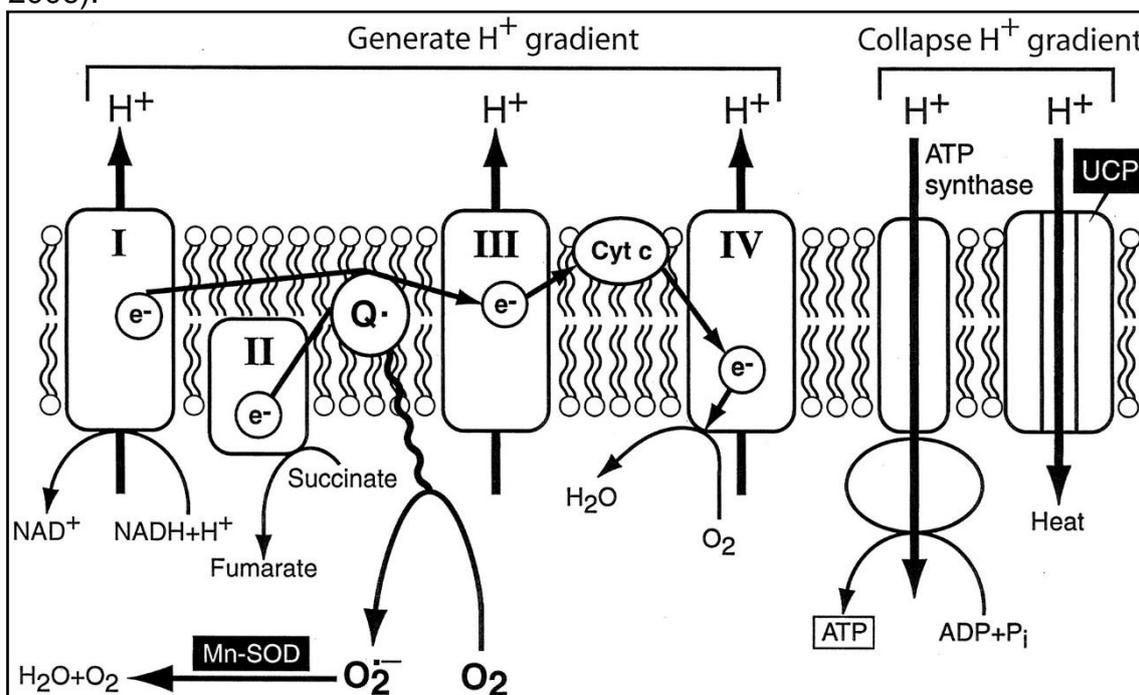
A passagem de elétrons através dos complexos da cadeia faz com que seja gerado um gradiente eletroquímico, transportando prótons para fora da matriz mitocondrial em direção ao espaço intermembranas, e gerando uma diferença de potencial. A energia deste gradiente eletroquímico (força próton-motriz) é 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

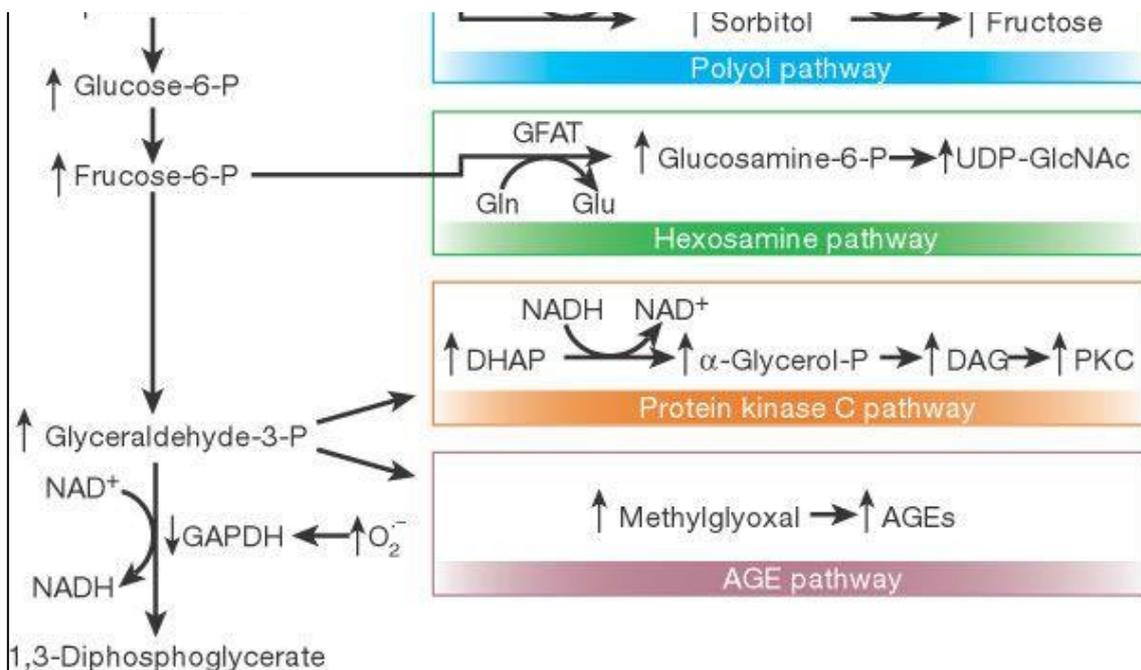
A captação de glicose por muitos tipos celulares ocorre por difusão facilitada sendo, portanto, mais afetada pela alta concentração de glicose no sangue e independente da insulina circulante. Este tipo de captação de glicose ocorre principalmente nos tecidos mais suscetíveis às complicações a longo prazo 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 FADH<sub>2</sub>. 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).



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



**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 ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), todos com propriedades químicas que conferem reatividade a diferentes moléculas. O ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) 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  $O_2^{\cdot-}$ , produzindo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que pode ser reduzido totalmente a  $H_2O$  ou parcialmente ao radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), um potente oxidante (Brownlee, 2005; Kurutas, 2016; Birben et al., 2012).

O  $O_2^{\cdot-}$  pode ainda reagir com outros radicais, como o óxido nítrico ( $^*NO$ ), 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 glutatona 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 glutatona reduzida (GSH), que é oxidada a glutatona 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 glutathione; 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, glutathione 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, glutathione, melatonina, coenzima Q, beta-carotenóides, alfa-tocoferóis e, também enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidases, glutathione redutases e glutathione-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 glutatona 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  $NO_2$  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 glutatona, aumentando a síntese de GSH. O GSH (glutatona 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- $\beta$ . 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 O<sub>2</sub> 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- $\kappa$ 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,

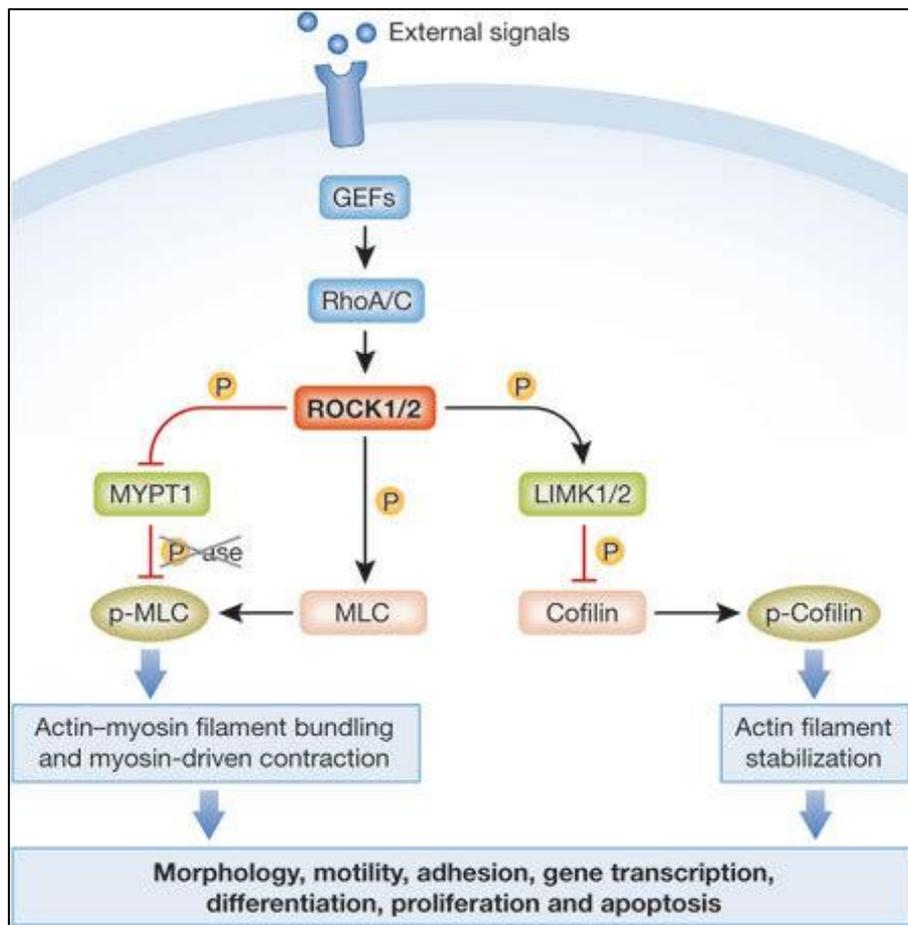
2004; Lawson & Ridley, 2018).

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 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.,



**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).

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 & Shiekhattar, 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- $\beta$ 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<sup>+</sup>, 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 conseqüentemente a regulação do citoesqueleto.

Em câncer de mama, o miR-31 inibe diretamente a expressão das subunidades de integrinas como  $\alpha 5$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha v$  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 GTPses 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.

## 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 <sup>1</sup>

AGHAJANIAN, A.; WITTCHEN, 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.

---

<sup>1</sup> 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  $\beta$ 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.; SACKESSEN, 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.; STAHL, 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  $\beta$ -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](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.