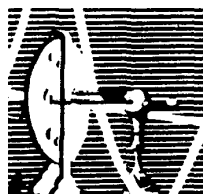


GUSTAVO CONDE MENEZES

MIGRAÇÃO E REMODELAMENTO DE MATRIZ
EXTRACELULAR POR FIBROBLASTOS
HUMANOS PRÉ-SENECENTES, NORMAIS OU
TRANSFORMADOS, CULTIVADOS EM GÉIS DE
COLÁGENO DO TIPO I

TESE SUBMETIDA AO INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS
FILHO, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, VISANDO
A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Gustavo Conde Menezes

MIGRAÇÃO E REMODELAMENTO DE MATRIZ EXTRACELULAR
POR FIBROBLASTOS HUMANOS PRÉ-SENESCENTES, NORMAIS
OU TRANSFORMADOS, CULTIVADOS EM GÉIS DE COLÁGENO
DO TIPO I

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Biofísica), Instituto de
Biofísica Carlos Chagas Filho,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários para
a obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Fenando Costa e Silva Filho

Rio de Janeiro, RJ

2008

Menezes, Gustavo Conde

Migração e remodelamento de matriz extracelular por fibroblastos humanos pré-senescentes, normais ou transformados, cultivados em géis de colágeno do tipo I / Gustavo Conde Menezes. Rio de Janeiro, 2008. xi, 163 f.: il.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biofísica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2008.

Orientador: Fernando Costa e Silva Filho

1. Matriz extracelular. 2. Colágeno. 3. Matriz 3D. 4. Mecanotransdução de Sinais. 5. Remodelamento de Matriz Extracelular. 6. Contração de Gel de Colágeno. 7. Migração Celular. 8. Migração em Matriz 3D. 9. Transformação Celular. 10. Câncer - Tese. I. Silva-Filho, Fernando Costa. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Título.

RESUMO

MENEZES, G. C. **Migração e remodelamento de matriz extracelular por fibroblastos humanos pré-senescentes, normais ou transformados, cultivados em géis de colágeno do tipo I.** Rio de Janeiro, 2008. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica)) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008

A relação entre o remodelamento de matriz extracelular (MEC) e a migração de células em matrizes tridimensionais (3D) é um campo de estudo ainda inexplorado. Muitos dados publicados na literatura sugerem uma correlação direta entre a capacidade de remodelamento de MEC e a migração de células normais. Recentemente, contudo, esta relação se tornou controversa, uma vez que alguns relatos foram publicados nos quais esta relação não é observada. Além disso, células transformadas geralmente possuem fenótipo migratório mais acentuado, mas há relatos de que fibroblastos transformados *in vitro* perderiam parte da habilidade de remodelar géis de colágeno. O presente trabalho demonstra que a imortalização de fibroblastos humanos pré-senescentes, pela expressão de hTERT e E6/E7, associada a expressão do alelo oncogênico de H-Ras (H-Ras^{V12}), não causa inibição na habilidade destas células de remodelar géis de colágeno do tipo I. Entretanto, fibroblastos normais que tiveram seu crescimento bloqueado por inibição por contato perderam parcialmente o potencial de contrair as matrizes de colágeno 3D. Quanto a migração celular, fibroblastos que expressam H-Ras^{V12} apresentaram maior taxa de migração em matrizes de colágeno 3D quando tratados com BSA, LPA, PDGF ou soro fetal bovino (SFB). Mais, o translocamento celular entre matrizes com densidades muito distintas é inibido em fibroblastos normais, enquanto aqueles que expressam o alelo oncogênico de H-Ras têm mais facilidade na transposição. Conclui-se que a degradação de p53, a inibição de pRB e a hiperativação de H-Ras não contribuem para a redução da habilidade de remodelamento de MEC observada em células transformadas *in vitro*. Além disso, células com o alelo oncogênico de H-Ras apresentam maior capacidade de translocamento entre matrizes com densidades distintas, sugerindo que mutações em genes de *ras* possam ser necessárias para a transposição de células tumorais do estroma reativo para os tecidos adjacentes. Por fim, os resultados do trabalho permitem sugerir que os fenômenos de remodelamento de MEC e migração celular podem apresentar alguns mecanismos de ação compartilhados, mas aparentemente há diferenças significativas no conjunto de mecanismos que atuam em cada processo, de modo que uma correlação direta nem sempre é observada.

ABSTRACT

MENEZES, G. C. **Migração e remodelamento de matriz extracelular por fibroblastos humanos pré-senescentes, normais ou transformados, cultivados em géis de colágeno do tipo I.** Rio de Janeiro, 2008. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica)) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008

The relationship between extracellular matrix (ECM) remodeling and cell migration in three-dimensional (3D) matrices is still an unexplored field. Many published data suggest that there is a direct correlation between ECM remodeling ability and cell migration of normal cells. Recently, though, this relationship became controversial since some reports in which this correlation was not observed were published. Moreover, transformed cells usually display an accentuated migratory phenotype, though there are reports that *in vitro* transformed cells partially lose their collagen remodeling ability. The present work shows that pre-senescent human fibroblast immortalization through expression of hTERT and E6/E7, associated with the expression of an oncogenic allele of H-Ras (H-Ras^{V12}), do not cause an inhibition in the ability of these cells to remodel type I collagen gels. However, normal fibroblasts growth-arrested by contact inhibition did partially lose their potential to remodel the 3D collagen matrices. Regarding cell migration, H-Ras^{V12}-expressing fibroblasts exhibited higher migration rates in 3D collagen matrices when treated with BSA, LPA, PDGF or fetal bovine serum. In addition, cell translocation between matrices with very distinct densities is inhibited in normal fibroblasts, while those that express the oncogenic allele of H-Ras could translocate more easily. We conclude that the degradation of p53, the inhibition of pRB and the overactivation of H-Ras do not contribute to the loss of remodeling ability observed in *in vitro* transformed cells. Moreover, cells expressing the oncogenic allele of H-Ras exhibit higher ability to translocate between matrices with distinct densities, suggesting that mutations in *ras* genes might be necessary for tumor cell translocation from the reactive stroma to the surrounding tissues. Finally, the results of the present work allow us to suggest that the phenomena of ECM remodeling and cell migration may share common mechanisms of action, though apparently there are significant differences in the collection of mechanisms acting in each process, such that a direct correlation is not always observed.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia da Superfície Celular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e no Departamento de Biologia Celular, da *University of Texas Southwestern Medical Center* (Estados Unidos da América), sob a orientação do Prof. Dr. Fernando Costa e Silva Filho e colaboração do Prof. Dr. Frederick Grinnell, com o apoio (financiamento e bolsas de estudo no país e no exterior) das seguintes agências:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)
- Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Programa de doutorado com estágio no Exterior (PDEE/CAPES)
- Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB/UFRJ)
- MCT - Instituto do Milênio de Bioengenharia Tecidual
- *National Institutes of Health* (NIH)

Mudança
É o tema da dança
Da vida que nos alcança
Trazendo consigo a esperança

De vida
Muitas vezes doída
Mesmo que seja corrida
Nos brinda com a bela nascida

Menina
Semente divina
Pelos pais tão querida
Flor mais formosa, pequena Marina

Dedico esta tese à minha filha, Marina de Faria e Souza Menezes

AGRADECIMENTOS

Agradeço o apoio, ajuda, compreensão, amizade e amor de todos aqueles que participaram comigo nesta longa e difícil jornada de pouco mais de 4 anos. Em especial gostaria de agradecer à minha mulher Laís e ao amigo/irmão Bruno. Não fossem por eles, certamente esta tese não existiria. Em segundo lugar ao meu orientador Fernando, cujo convívio de quase 10 anos foi determinante na construção da minha formação científica. Imagino que poucos orientadores tenham sua capacidade de ensinar o que é Ciência em conversas constantes no dia-a-dia de trabalho. Um agradecimento especial também ao meu orientador no doutorado-sanduíche, Frederick Grinnell, cujas colaborações no campo prático e teórico foram imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ainda aos colegas de Laboratório de Biologia da Superfície Celular: Mariane, Débora, Thiago, Renato, Zé Bastista, Léo e demais membros que foram e vieram. Aos membros do Laboratório do Prof. Frederick Grinnell: Chin Han, Miguel, Hongmei e Sangmyung. Aos Profs. Wanderley, Márcia, Narcisa, Cristina, Técia, Rossiane, Rosália e Marcelo, assim como aos demais membros dos Laboratórios de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer e de Neurobiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Agradeço também aos funcionários do mesmo Instituto.

Agradeço por fim aos meus familiares e amigos/irmãos Vinícius e Diogo, que fazem a vida ser prazerosa.

“Reality is merely an illusion, albeit a very persistent one”

Albert Einstein

ABREVIACOES E SIGLAS

2D	bidimensional
3D	tridimensional
AEBSF	do inglês, <i>4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride</i>
aFGF	do inglês, <i>acid fibroblast growth factor</i>
AMC	do inglês, <i>anchored matrix contraction</i>
bFGF	do inglês, <i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	do inglês, <i>bovine serum albumin</i>
DMEM	do inglês, <i>Dullbecco's modified Eagle medium</i>
EDTA	do ingls, <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FMC	do ingls, <i>floating matrix contraction</i>
GAPDH	do ingls, <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
HEPES	do ingls, <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HPV	do ingls, <i>human papillomavirus</i>
HRP	do ingls, <i>horse radish peroxidase</i>
hTERT	do ingls, <i>human telomerase reverse transcriptase</i>
LPA	do ingls, <i>lysophosphatidic acid</i>
MEC	matriz extracelular
PDGF	do ingls, <i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	do ingls, <i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PI3K	do ingls, <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PKC	do ingls, <i>protein kinase C</i>
PVDF	do ingls, <i>Polyvinylidene Fluoride</i>
RNAi	do ingls, <i>interfering ribonucleic acid</i>
S1P	do ingls, <i>sphingosine-1-phosphate</i>
SDS	do ingls, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	do ingls, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	soro fetal bovino
SHC	do ingls, <i>Src homology 2</i>
SMC	do ingls, <i>stress-relaxed matrix contraction</i>
SV40	do ingls, <i>simian virus 40</i>
TGF- β	do ingls, <i>tumor growth factor beta</i>
Tris	do ingls, <i>2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol</i>
VEGF	do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>

ÍNDICE

Introdução	1
Racional e premissas de trabalho.....	54
Hipótese de trabalho	56
Materiais e métodos.....	57
Resultados.....	72
Discussão	127
Conclusão	136
Referências	137

1. Introdução

1.1. Histórico do cultivo de células, em particular de fibroblastos humanos, em ambientes bi e tridimensionais

Os materiais utilizados para cultivo de células de mamíferos que se tornaram mundialmente difundidos são aqueles que incluem substratos rígidos, planares, feitos de vidro ou plásticos submetidos a tratamentos especiais. Tais materiais permitem maior controle experimental e são de simples manejo. Nas últimas décadas, contudo, se observa na literatura científica um grande interesse pelo cultivo de células de mamíferos, em particular de humanas, em ambientes tridimensionais (3D). Isto é, o cultivo celular com o uso de substratos flexíveis estruturados em 3D. Esta tendência se deve principalmente ao fato deste tipo de cultivo proporcionar um ambiente mais parecido com aquele observado *in vivo*, de modo que a fisiologia celular também se aproxima daquela observada no corpo humano. Cabe aqui ressaltar que alguns poucos tipos de células, como as epiteliais (em epitélios simples) e os osteoclastos humanos, apresentam-se *in vivo* associadas a superfícies planares ou a ambientes 2D. Apesar do cultivo de células em matrizes 3D ter se tornado um método de pesquisa disseminado apenas na última década, em particular nas pesquisas relacionadas à bioengenharia de tecidos, por motivos técnicos o cultivo de células *in vitro* foi iniciado justamente em matrizes deste gênero [1, 2].

O cultivo de células individualizadas oriundas de organismos multicelulares tem pouco mais de 100 anos e demorou a ser desenvolvido considerando que as primeiras células vivas foram observadas pelo então alfaiate Thonius Philips van Leeuwenhoek por volta de 1670. O motivo principal para este retardo se deveu aos desafios técnicos que o cultivo *in vitro* apresentava aos cientistas, mas também porque o conhecimento sobre células era ainda muito limitado. O cultivo de tecidos, humanos ou não, em condições extra-corpóreas foi proposto e alcançado apenas no século XIX como forma de se estudar as características destas estruturas, ainda vivas, em condições ambientais mais controladas e acessíveis do que aquelas encontradas no corpo de animais superiores. Os primeiros passos neste sentido foram dados por Sydney Ringer, o qual divulgou seus resultados experimentais em uma série de artigos iniciados em 1882.

Nestes, o autor demonstrava que corações extirpados de sapos continuavam a bater, às vezes por longos períodos, na presença de soluções salinas, tais como sais de sódio, potássio, cálcio e/ou magnésio [3]. Os experimentos com corações vivos eram especialmente prestativos na medida em que a sobrevivência celular era comprovada pelo batimento cardíaco. Mas Ringer não se limitou a este modelo e descreveu ainda os processos de plasmólise, turgidez e lise celulares em excisões de tecido branquial de mexilhões do gênero *Anodon*, demonstrando assim a importância dos fenômenos de difusão e pressão osmótica sobre as células. Seus estudos levaram a formulação da solução de Ringer, que agora conta com inúmeras variantes, e serviu de base para a formulação dos meios de cultivo utilizados nos dias de hoje. O crédito pelo estabelecimento dos princípios do cultivo de tecidos de animais, entretanto, foi dado a Wilhelm Roux, que em 1885 removeu uma porção da placa medular de embriões de pinto e o manteve em solução salina aquecida por uma série de dias [4].

Apesar do fato de que o cultivo de tecidos em ambientes extra-corpóreos tornava-se realidade, o cultivo de células de mamíferos individualizadas apresentava dificuldades ainda no campo teórico. A idéia de que células de organismos multicelulares eram unidades de vida individualizadas foi proposta claramente apenas em 1811 por Ludolph Christian Treviranus [5]. Em 1824 Henri Dutrochet teorizou que “a célula é o elemento fundamental de organização” da vida [6], mas demorou ainda mais de uma década para que a teoria fosse aceita pela comunidade científica, através de trabalhos desenvolvidos por Matthias Jakob Schleiden [7] e seu professor, Theodore Schwann [8]. A teoria celular clássica não foi completada até 1858, quando Rudolf Virchow concluiu que as células são formadas a partir de outras pré-existentes [9]. É interessante lembrar ainda que nesta mesma época Darwin publicava seu livro *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* [10], e Pasteur conduziria na década de 1860 experimentos demonstrando que a teoria da geração espontânea era falha. Era, portanto, uma época de descobertas e formulações de teorias ainda basais no campo da Biologia, particularmente no que tange as células.

Como consequência, foi apenas a partir de 1907 que Ross Granville Harrison, inicialmente na *Johns Hopkins Medical School* e em seguida na Universidade de Yale, publicou trabalhos no qual estabelecia as bases metodológicas para o cultivo de células provenientes de explantes neurais de embriões de anfíbio [1, 2]. Anteriormente outros

pesquisadores já haviam examinado células eucarióticas superiores *in vitro*, mas nenhum as havia cultivado por semanas como Harrison conseguiu com neurônios de sapo. Além disso, a demonstração prática de que células individualizadas apresentavam vida própria foi por si só de grande impacto e permitiu ao autor reafirmar a “doutrina neural”. Segundo esta doutrina, as células eram a base estrutural e unidade funcional do sistema nervoso. Em contraposição à “doutrina neural” havia a “teoria reticular” que propunha ser o sistema nervoso um retículo ou rede celular interligada.

A técnica desenvolvida para o cultivo de células foi uma adaptação da gota pendente, já utilizada anteriormente para manter embriões de anfíbios *in vitro* e assim analisar seu desenvolvimento. Inicialmente, Harrison cultivou as células em gota pendente composta de líquido nutritivo. Entretanto, as células pouco faziam além de sobreviver. Em seguida decidiu por não mais cultivá-las suspensas em meio líquido mas envoltas por uma matriz extracelular (MEC) derivada de coágulos do líquido linfático (figura 1). A técnica permitiu que Harrison observasse células individuais migrando e formando neuritos (finas projeções de membranas de células nervosas). Também demonstrou a importância do substrato no cultivo de células, uma vez que, ainda hoje, a chave para a formação de neuritos é o cultivo de neurônios em substratos rígidos, assim como o crescimento de explantes neurais é realizado em matrizes protéicas (principalmente colágeno). A era do cultivo de células se iniciava justamente com o emprego de um arcabouço 3D composto principalmente por proteínas.

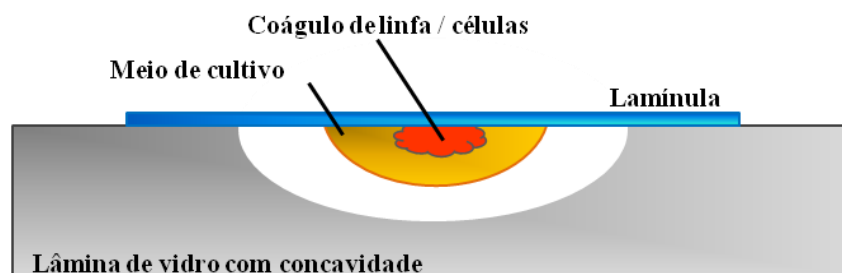


Figura 1. **Modelo de cultivo de células empregado por Ross Granville Harrison.** O coágulo de linfa atuou como substrato de cultivo, o qual permanecia submerso em meio de cultura em gota pendente.

Ainda em 1910, Ross Harrison já trabalhava em Yale e recebeu em seu laboratório Montrose Burrows, pesquisador do *Rockefeller Institute* de Nova Iorque que vinha para aprender a nova técnica de cultivo de células. Enquanto esteve no laboratório

de Harrison, Burrows adaptou o protocolo original e passou a cultivar tecidos de embrião de pinto em coágulos de plasma de galinha, o primeiro cultivo de células de animais de sangue quente. Depois de estabelecer esta modificação, Burrows, de volta ao *Rockefeller Institute* no laboratório do cirurgião Alexis Carrel, cultivou diversos tecidos embrionários e adultos de cães, gatos, galinhas, ratos e porcos da Índia utilizando plasma fresco de animais da mesma espécie. Em 1911, Burrows e Carrel, que no ano seguinte ganharia o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, publicam um trabalho no qual descrevem pela primeira vez o cultivo de diversos tecidos humanos normais e tumorais [11]. Além de serem as primeiras células humanas cultivadas, eles criam o método de cultivo em um substrato bidimensional (2D) (no caso, o cultivo de células sobre uma grande placa de vidro preto), o cultivo em incubadoras úmidas com temperatura controlada, e ainda atentam à necessidade de assepsia. Citando os autores: “Nós usamos, primeiramente, o método de cultura de Harrison, isto é, de pequenos pedaços de tecido suspensos em uma gota pendente de plasma. Em seguida, nós desenvolvemos um método de cultura em uma placa, que nos permitiu crescer grandes quantidades de tecidos. (...) A cultura deve ser feita em sala de operação quente e úmida com os mesmos cuidados e rapidez de uma operação cirúrgica delicada.” Os autores foram ainda os primeiros a fazer subculturas, ao fazer cortes nos explantes e transferi-los para novos coágulos de plasma, criando assim linhagens celulares cultivadas por meses [12].

O laboratório de Alexis Carrel continuou a desenvolver novas técnicas de cultivo de células, especialmente frascos que permitiam maior praticidade de manejo. Como se nota no texto de seu primeiro artigo de 1911, sua preocupação com a quantidade de tecido produzido, e conseqüente facilidade de manejo e visualização, era de grande importância. Assim, em 1923 seu laboratório desenvolveu os primeiros frascos circulares de vidro, chamados frascos-D; um frasco D-3.5 tinha 3.5 cm de diâmetro. Os frascos permitiam que os coágulos de plasma fossem crescidos em volumes de meio de cultivo muito maiores e facilitavam no manejo para troca de meios e durante subculturas [13]. Pela metade da década de 1920 o desenvolvimento das técnicas de cultivo em substratos de vidro desenvolvidas pelo laboratório de Carrel se tornou o método padrão ao redor do mundo. Em 1947 William Earle introduziu os frascos de vidro do tipo “T”, que tinham forma hexagonal ou retangular. O “T” se referia à área de superfície para cultivo, como por exemplo o frasco T-25 que

apresentava 25 cm² de área para cultivo das células. Na década de 1950 se formularam meios de cultivo semi-definidos e se começou a utilizar tripsina para dissociação de tecidos e realização de subculturas. Entre os cultivos mais famosos da época, se destaca a linhagem HeLa, originada de um explante do ovário de Henrietta Lacks, pelo Prof. George Otto Gey, na *Johns Hopkins Medical School*. Após dissociação das células, a cultura HeLa foi mantida e subcultivada por quase dois anos, e células derivadas desta linhagem são mantidas ainda hoje.

Já na década de 1960, como o desenvolvimento da engenharia de materiais plásticos ou polímeros, os frascos de poliestireno do tipo “T” especialmente tratados para aumentar a adsorção de proteínas, e conseqüentemente a adesão celular, se tornaram disponíveis. Claramente, todos esses avanços na área de cultivo de células se deram na direção da simplificação da metodologia de trabalho e do aumento da quantidade de células cultivadas. Em decorrência, o cultivo de células de mamíferos em substratos planos se difundiu por todos os laboratórios do mundo, enquanto o cultivo em matrizes protéicas 3D foi relegado a segundo plano.

O cultivo em matrizes protéicas só volta a ter importância científica e clínica a partir da década de 1970. Em 1956, Abercrombie e colaboradores publicam artigo no qual implicam as células do tecido conjuntivo na geração de forças responsáveis pela contração das lesões no processo de cicatrização [14]. No mesmo ano foi sugerido que o tecido de granulação formado durante a cicatrização seria um “órgão de contratura” [15]. Estudos subseqüentes demonstraram que as células que geravam força de contração se localizavam nas margens da lesão e não no centro do tecido de granulação [16]. Mas foi apenas em 1972 que Gabbiani e colaboradores demonstraram que fibroblastos contidos em excisões de tecidos de granulação eram capazes de gerar contrações e apresentavam organização dos filamentos de actina (fibras de tensão) parecida com aquela observada em células de músculo liso [17]. Hoje se sabe que estes “miofibroblastos” são responsáveis não só por gerar as forças que contraem as lesões do conjuntivo, mas sua presença se tornou uma característica geral de tecidos em processo de contração [18].

Conjuntamente com os resultados publicados por Gabbiani e colaboradores [17] foi iniciada a publicação de uma série de trabalhos nos quais as técnicas de cultivo de células em matrizes 3D se tornavam metodologias essenciais na pesquisa desenvolvida. Foi neste ano que Tom Elsdale e Jonathan Bard publicaram um trabalho demonstrando

que fibroblastos cultivados em matrizes de colágeno do tipo I apresentavam características fenotípicas parecidas com aquelas vistas *in vivo* que, todavia, não eram observadas em cultivos em monocamadas [19]. Eles descreveram ainda que as células migratórias cultivadas nas matrizes flutuantes em meio de cultura levavam à contração da matriz tornando-a um “corpo denso e opaco com menos de um décimo do tamanho original”. No ano seguinte um processo similar foi observado com fibroblastos cultivados em matriz 3D de fibrina [20]. Em seguida, Eugene Bell, hoje reconhecido como o fundador da Bioengenharia de Tecidos, realiza estudos inicialmente do MIT e, em seguida, na sua empresa (*Tissue engineering Inc.*), visando compreender o processo de contração que ocorre durante a cicatrização de lesões da pele e desenvolve um método simples de estudo *in vitro* do fenômeno de reorganização da matriz de colágeno por fibroblastos [21].

Desde então o cultivo celular em matrizes 3D se difundiu, não apenas como ferramenta para o estudo de fenômenos celulares diversos, mas como foco de estudo em si. As áreas de bioengenharia e de implantes de tecidos e órgãos, por exemplo, se baseiam quase que exclusivamente no desenvolvimento de metodologias e produtos nos quais as células são cultivadas em ambientes 3D, sejam tais ambientes compostos por produtos naturais ou sintéticos [22]. Também nos testes *in vitro* de fármacos as análises em cultivos 3D já são freqüentes, haja visto que a fisiologia celular neste tipo de cultivo é mais próxima àquela observada *in vivo*.

1.2. Tensegridade e mecanobiologia do cultivo celular em matrizes 3D

A cultura de células em ambientes 3D apresenta, obviamente, diversas diferenças em relação àquela realizada em 2D. Quando cultivadas em substratos plásticos planos, células não transformadas se organizam em monocamadas polarizadas. Nesta condição, as células interagem entre si apenas lateralmente, enquanto suas superfícies “basal” e “apical” se estruturam bioquímica e mecanicamente em resposta a ambientes extremamente rígidos (substrato plástico) ou maleáveis (meio de cultura solúvel). Este ambiente físico não é representativo das estruturas naturais dos tecidos humanos; mesmo os epitélios com apenas uma camada de células (o intestinal, por exemplo) não interagem com um substrato de rigidez comparável aos plásticos e vidros

utilizados em culturas de células. Como as células de mamíferos respondem à física e à mecânica do ambiente via constante reestruturação de seus esqueletos e fisiologia, fenômeno conhecido como tensegridade [23], as diferenças do comportamento celular em cultivos 2D e 3D são evidentes. Características físicas do ambiente, como topografia, textura e elasticidade (tribologia) podem influenciar comportamentos celulares tão diversos quanto a entrada em mitose [24] e a diferenciação de células mesenquimais [25], em grande parte por mecanismos hoje denominados como mecanotransdução de sinais [26, 27].

Os mecanismos de mecanotransdução não são os únicos a exercer influência nas diferenças observadas no comportamento celular em cultivos realizados em 2D e 3D, mas são, possivelmente, os mais importantes. Se classificados de modo simplificado, os aspectos mecânicos do ambiente celular reconhecidos pelas células seriam a viscosidade e geometria do substrato e as forças envolvidas nas relações célula-célula e célula-MEC, na escala nano e micrométrica. Isto é, desde a estrutura das glicoproteínas até a célula como um todo. Diversos modelos de mecanotransdução estão emergindo na literatura científica onde proteínas sofrem mudanças conformacionais em decorrência de forças mecânicas aplicadas sobre elas; mudanças essas que se traduzem em resposta morfofuncional [28]. A este processo de conversão de sensibilidade mecânica em respostas celulares, via eventos bioquímicos intracelulares, é que se dá o nome de mecanotransdução de sinais [26, 27]. Os parâmetros mecânicos envolvidos nos eventos celulares são extremamente complexos e envolvem rigidez e dinâmica global e locais da matriz extracelular e do citoesqueleto, fluidez e dinâmica dos fluidos extracelular e intracelular, afinidade, número e organização das adesões célula-célula e célula-MEC, número e organização de canais de íons mecanossensíveis, entre outros.

O mecanismo de mecanotransdução de sinais mais comumente observado é aquele decorrente da rigidez do substrato [29, 30]. No caso de cultivos em superfícies 2D (plásticos ou vidros) os substratos são rígidos; isto é, não podem ser moldados pelas forças impostas pelas células. Conseqüentemente, a célula adequa a sua forma em função da MEC secretada (ou adsorvida) sobre o substrato plano, de modo que as células se espalham sobre ele. Tal adequação morfofuncional das células ocorre como conseqüência da rigidez do substrato, e diz respeito à necessidade da célula em aderir e se espalhar posto que, do contrário, ela fica susceptível à apoptose [31]. Por outro lado, tal espalhamento celular ocorre via regiões pontuais de interação entre a célula e a MEC

adsorvida ao substrato, conhecidos como contatos e adesões focais [32, 33, 34, 35]. A célula aderida a um substrato rígido, via adesões focais, encontra alta resistência às forças de contração exercidas por seus complexos de microfilamentos e miosinas II. A resultante deste fenômeno é uma sinalização intensa a partir destes complexos de adesão no sentido da manutenção da viabilidade celular, assim como a indução de secreção e deposição de MEC, e migração e proliferação celulares (figura 2) [26, 27, 28, 36, 37].

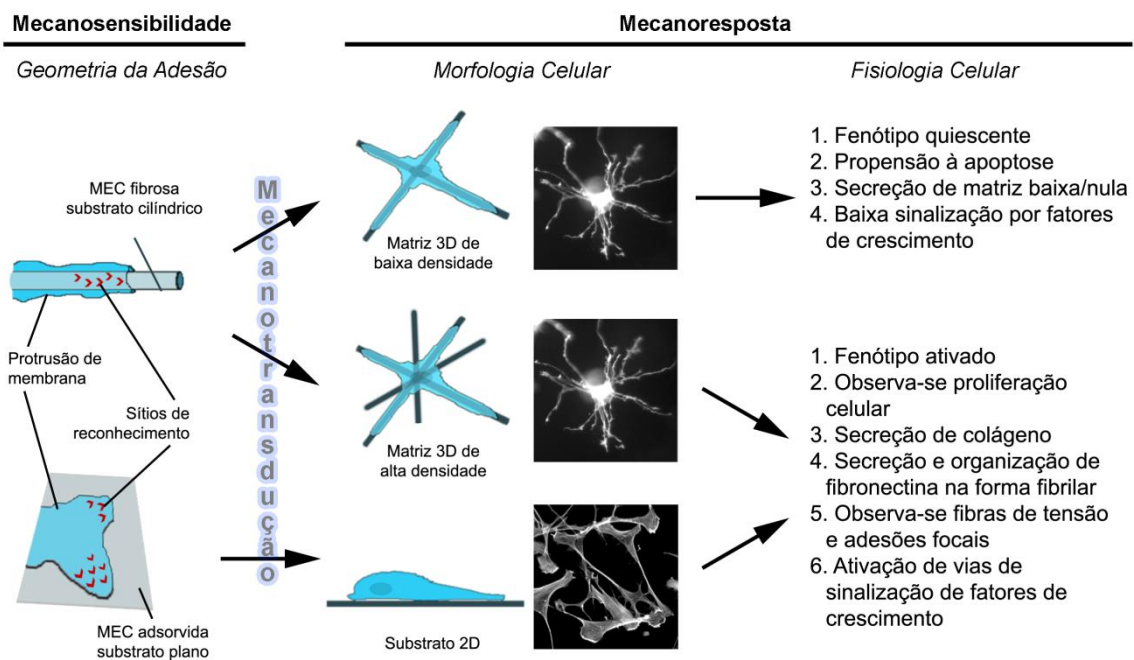


Figura 2. **Efeitos da mecanotransdução de sinais em fibroblastos humanos em função do substrato de cultivo.** Livremente adaptado de Vogel e Sheetz, 2006.

Por outro lado, o cultivo de células em substratos de baixa tensão mecânica, isto é, cuja estrutura e organização molecular cedem às forças exercidas pelas células, induz à expressão de atividades celulares opostas àquelas em matrizes associadas a substratos planares rígidos (figura 2). Por exemplo, matrizes 3D de colágeno contendo fibroblastos e cultivadas soltas do substrato sofrem um remodelamento ao longo do tempo que leva à redução dos seus volumes em decorrência de atividades celulares. Em parte, este processo de contração da matriz é função dos mesmos mecanismos que, em substratos rígidos, levam as células a adquirirem a morfologia de espalhamento sobre o substrato, mediadas por proteínas de adesão celular a MEC. Todavia, a fisiologia das células neste caso é bastante distinta daquela observada em substratos rígidos: os fibroblastos

apresentam baixa síntese de colágeno e DNA [38, 39]. Outra observação interessante foi realizada com fibroblastos cultivados em matrizes 3D de colágeno cuja tensão interna poderia ser variada por um aparelho que aplicava cargas mecânicas sobre o gel [40]. Neste caso, as células reagiam às mudanças na tensão da matriz de modo inversamente proporcional à carga aplicada sobre o gel; isto é, ao aumento da carga mecânica aplicada sobre o gel as células respondiam reduzindo sua capacidade de contração enquanto uma diminuição da carga induzia o aumento da contração mediada pelas células. Esta observação demonstra, ainda que superficialmente, o caráter recíproco que decorre da interação entre células e substratos maleáveis.

A rigidez do substrato é fator preponderante nas diferentes expressões do fenótipo celular observado em cultivos 2D e 3D, mas não é o único. Da mesma forma que a célula pode ser regulada morfológica e funcionalmente pelo substrato, este também é regulado pelo comportamento celular. Desse modo, se estabelecem mecanismos de retroalimentação (*feedback*) entre as células e o substrato que são distintos nos casos de cultivos 2D e 3D.

Por exemplo: as forças mecânicas exercidas pelas células sobre a MEC, via adesões focais, podem modificar as moléculas da MEC fisicamente, levando à exposição de sítios críticos de interação, antes indisponíveis. O exemplo mais bem estudado é o da fibronectina. A fibronectina é uma glicoproteína que se associa a integrinas presentes na membrana plasmática e induz a formação das chamadas adesões focais nas células [33, 41]. Este tipo de adesão ocorre quando, na porção citoplasmática, a integrina se associa indiretamente a fibras de microfilamentos associadas a moléculas de miosina II, formando as chamadas fibras de tensão. Como o nome indica, da interação entre microfilamentos e miosinas se observa uma atividade contrátil cuja tensão final é exercida justamente sobre as glicoproteínas da MEC; no caso a fibronectina. Dado que a fibronectina esteja interagindo com outras moléculas da MEC (estando, portanto, “ancorada” em outro ponto que não o de associação à integrina da célula), a resultante da força exercida sobre ela é a modificação de sua estrutura secundária e decorrente apresentação de sítios críticos, isto é, de seqüências de aminoácidos que são sítios de interação com outras moléculas e que se encontravam inacessíveis até então [42, 43, 44].

Muitas outras evidências demonstram ainda o caráter mecanossensível dos sítios de adesão focal. Primeiro, a ativação da contração celular mediada por miosina II

acarreta no aumento das adesões focais [45, 46, 47], enquanto a inibição da atividade de miosina II induz o desaparecimento de adesões focais e acumulação de adesões do tipo complexos focais, que são compostos por integrinas mas não apresentam fibras de tensão [48, 49, 50, 51, 52]. Segundo, a aplicação de forças externas sobre as adesões focais estimula o crescimento dessa estrutura na direção em que a força foi impressa mesmo quando a atividade de miosina II é suprimida [53]. Terceiro, o tamanho das adesões focais e as forças aplicadas sobre elas apresentam relação proporcional, com coeficiente ($5 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$) surpreendentemente parecido entre diferentes tipos celulares [54, 55]. Por fim, a manipulação mecânica de esferas recobertas com fibronectina sobre a superfície de células aderidas reforça a força de adesão indireta entre as esferas e o citoesqueleto de actina [56, 57].

Contudo, em matrizes deformáveis e de baixa resistência mecânica, onde as forças exercidas pelas células não são resistidas pelo substrato (que se deforma), adesões focais tornam-se diminutas ou nem mesmo se formam [58, 59, 60]. Portanto, todas as funções mecanossensíveis das adesões focais só são observadas quando a célula é cultivada sobre um substrato resistente.

Face ao exposto acima, nota-se que as células aderentes são não só capazes de reconhecer o ambiente em que se encontram como também de modificá-lo ativamente, desencadeando, inclusive, novos sinais. Porém as características mecânicas do ambiente de cultivo são preponderantes no tipo de resposta celular que será observada. Em qualquer momento, sinais extracelulares (como hormônios, fatores de crescimento, estímulos mecânicos externos, etc.) podem causar mudanças agudas que iniciarão uma nova rodada de modificações na célula e na MEC, porém estas alterações serão claramente distintas se as células forem cultivadas em ambientes 2D rígidos ou 3D maleáveis.

Todavia, o aspecto mais intrigante dos estudos sobre mecanotransdução, e crucial nas diferenças de fisiologia celular observadas entre cultivos 2D e 3D, está na capacidade da célula de responder a mudanças na sua forma ou organização estrutural [61]. A sensibilidade geométrica, que pode influenciar desde sua sobrevivência até proliferação e diferenciação celular, pode ser definida como a formação de complexos de sinalização celular por mudanças espaciais nos sítios de reconhecimento molecular de acordo com a forma, ou geometria, do substrato em contato com a célula.

Um belo exemplo deste mecanismo foi demonstrado por Chen e colaboradores (1997) em células de endotélio capilar bovino [31]. Para verificar os efeitos da geometria na sobrevivência e proliferação celular os autores cultivaram as células em substratos não-adesivos, sobre os quais “ilhas” de fibronectina com forma (quadrangular) e tamanhos (de 25 a 1600 micrômetros quadrados) definidos foram adsorvidas e sobre as quais as células poderiam aderir. O resultado demonstrou que as células em “ilhas” menores eram mais propensas a entrar em apoptose e não proliferavam, enquanto células aderidas e espalhadas sobre áreas maiores proliferavam e nunca iniciavam morte celular programada. Evidentemente, o resultado poderia ser função da área de contato com o substrato de fibronectina e não da geometria da célula. Os autores solucionaram esta questão cultivando as células em ilhas de fibronectina circulares de 20 a 50 micrômetros de diâmetro ou diversas ilhotas distantes 10 micrômetros entre si e com 5 micrômetros de diâmetro, que permitiriam observar o comportamento de células com áreas semelhantes de contato com a fibronectina, mas espalhamentos (área projetada da célula) bastante distintos. Com efeito, ainda que as células apresentassem áreas iguais de contato com fibronectina, aquelas pouco espalhadas eram mais propensas a entrar em apoptose e não proliferavam, enquanto aquelas células que apresentavam maior área projetada apresentavam maior taxa de proliferação.

Estudos adicionais demonstraram que uma mesma proteína da MEC pode disparar sinais distintos em um mesmo tipo celular dependendo de sua organização estrutural, como quando está disposta em filamentos ou simplesmente adsorvida sobre um substrato plano [62, 63]. Além disso, diversos tipos celulares são capazes de responder a topografias de superfície na escala nanométrica [64]. Aparentemente, as células são capazes não só de reconhecer uma superfície côncava, como ainda o fazem de modo distinto em relação a uma superfície convexa. Em um experimento com substratos desenvolvidos por nanolitografia, a adesão celular sobre colunas de 13 nm de altura foram capazes de aumentar o espalhamento da célula, a formação de microfilamentos e sua taxa de proliferação [65]. Em contraposição, quando fibroblastos foram sujeitos a substratos com depressões nanométricas a adesão era menor se comparada a um substrato plano [66]. Esta diferença de resposta em relação à concavidade do substrato em escalas nanométricas parece ser função da deformação da membrana plasmática sobre o relevo do substrato, o que altera a conformação e

organização espacial da própria membrana, bem como de proteínas de membrana e/ou de proteínas citoplasmáticas associadas à membrana.

Há duas linhas de evidência que corroboram com a afirmativa acima. Primeiramente, os folhetos interno e externo da membrana plasmática apresentam tensão semelhante quando planas, mas bastante diferentes quando dobradas. Além de afetar a composição local de lipídios e, potencialmente, a distribuição e agregação de proteínas transmembrana, esta tensão diferencial pode levar a abertura de canais de íons mecanossensíveis como, por exemplo, canais de potássio [67]. Uma segunda linha de evidência advém de estudos relacionados à endocitose. Proteínas contendo domínios BAR (domínios Bin, amphiphysin, Rvs), como as Arfaptinas, são importantes mediadores do processo endocítico. As Arfaptinas não apenas induzem, mas também reconhecem curvaturas côncavas no folheto interno da membrana plasmática e, associadas a ela, são capazes de recrutar proteínas da família de pequenas GTPases, como Rac, fator de adenosinaribosilação-1 (ARF1), ARF3 e ARF6 [68, 69, 70]. Contudo, além da atividade no processo endocítico, tanto Rac como as ARFs estão implicadas na regulação de microfilamentos em processos como *ruffling* de membrana, migração celular e adesões célula-célula e célula-MEC [71, 72, 73, 74]. Assim, o recrutamento de proteínas com domínio BAR por membranas deformadas acaba por induzir efeitos profundos na fisiologia celular, uma vez que leva a ativação localizada de proteínas da família de pequenas proteínas G. Se considerarmos que os cultivos 3D são, em sua maioria, compostos por matrizes de proteínas fibrilares, a importância deste mecanismo de sensibilidade frente ao cultivo de células em substratos planos se torna bem mais evidente.

De todo modo, dificilmente os fenômenos categorizados como “sensibilidade geométrica” se devem unicamente a fatores físicos; frequentemente simples eventos bioquímicos são responsáveis por parte das respostas observadas. Além disso, outros mecanismos de mecanotransdução podem se fazer presentes. Por exemplo, quando fibroblastos são cultivados em matrizes 3D de colágeno do tipo I (com densidades de 1.5 a 4 mg/mL) inicialmente as células adquirem uma morfologia dendrítica, enquanto em substratos rígidos como os plásticos planos as células se espalham sobre o substrato tornando-se chatas (figuras 2 e 3). Muitas diferenças fisiológicas são observadas entre estes dois tipos de cultivo e, ingenuamente, seria possível supor que as variações devessem à morfologia, ou geometria, celular. Entretanto, se observa que as diferenças

fisiológicas se devem principalmente à rigidez do substrato no qual a célula é cultivada, uma vez que em cultivos 3D com maior densidade de colágeno (aproximadamente 4 mg/mL) a célula permanece dendrítica mas a fisiologia é distinta daquela em matrizes de baixa densidade e mais próxima à de cultivos em 2D (dados não publicados de Miguel Mirón-Mendoza e Frederick Grinnell).

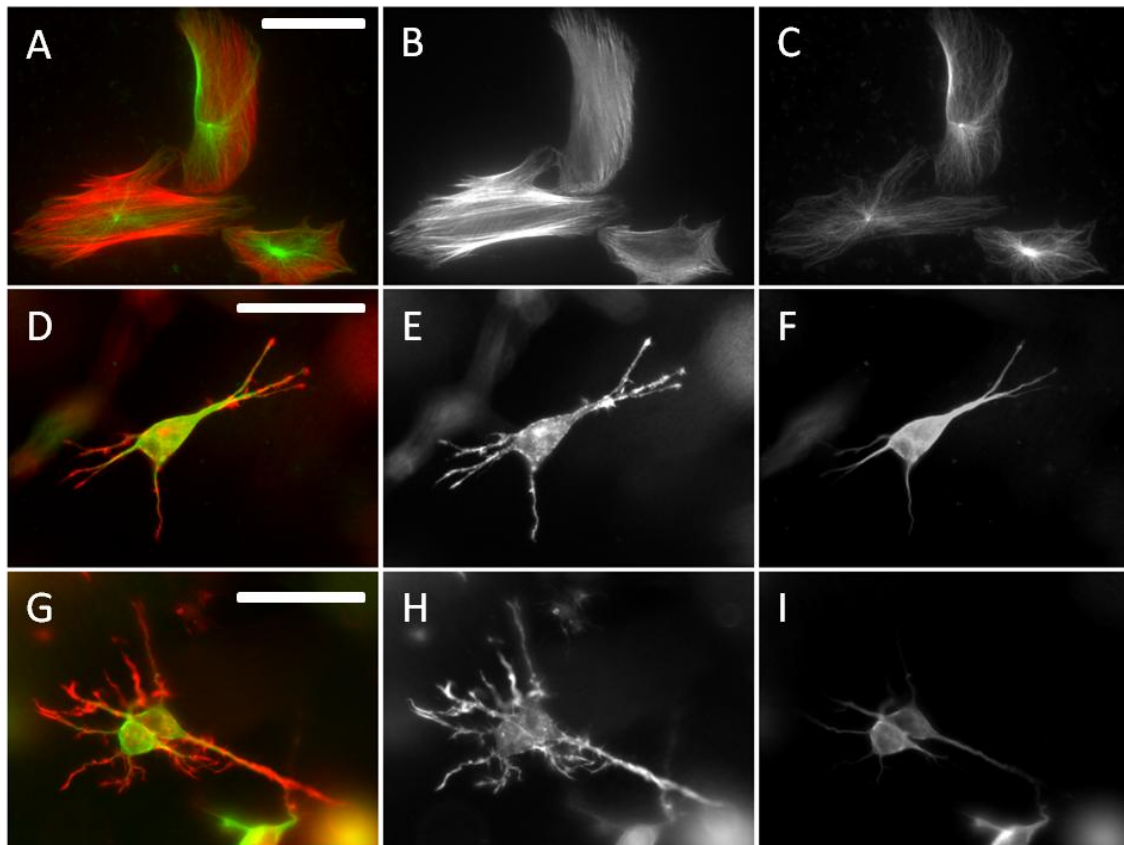


Figura 3. **Fibroblastos humanos em cultivos 2D e 3D de colágeno.** (A-C) Fibroblastos humanos cultivados em meio com soro fetal bovino 10% sobre lamínulas de vidro recobertas com colágeno do tipo I. (D-I) Fibroblastos humanos cultivados em meio com 5 mg/ml de BSA (D-F) ou meio com 5 mg/ml de BSA e 50 ng/mL PDGF (G-I) inseridos em géis de colágeno do tipo I. (A,D,G) Padrão de marcação de microfilamentos (vermelho) e microtúbulos (verde). (B,E,H) Padrão de marcação de microfilamentos. (C, F, I) Padrão de marcação de microtúbulos. Barras: 50 μ m.

Considera-se, portanto, que a mecanotransdução de sinais exerce papel preponderante na fisiologia celular, de modo que as características físicas do ambiente de cultivo devem ser atentamente consideradas. Uma vez que os cultivos 2D são, praticamente em sua totalidade, realizados sobre substratos rígidos que não podem ser modelados pelas células, as células adquirem características distintas daquelas

observadas *in vivo*. Os cultivos em géis protéicos maleáveis e de estrutura 3D vêm sendo desenvolvidos justamente para reduzir a diferença entre a fisiologia celular *in vivo* e *in vitro*.

1.3. A matriz de colágeno do tipo I como modelo de cultivo de células e sua mecanobiologia

In vivo, a MEC é tecido-específica, heterogênea, composta por uma complexa variedade de biomoléculas e água. Os principais componentes estruturais de muitos tecidos são os colágenos, que representam aproximadamente 25% da massa total de proteínas em mamíferos, e em particular o colágeno do tipo I, que representa 90% da massa de colágenos no corpo [75]. Outros componentes estruturais majoritários das MECs de tecidos humanos incluem: as proteoglicanas, cujas cargas de suas glicosaminoglicanas associadas tornam estas moléculas altamente hidratadas conferindo ao tecido resistência a compressões; as fibronectinas, que se associam às integrinas na membrana das células, mas também a proteínas da MEC, tais como colágenos, heparina, fibrina e outras fibronectinas formando fibras; e elastina, que se polimeriza formando uma matriz que confere elasticidade aos tecidos. Enquanto estas (e muitas outras menos abundantes) contribuem para a integridade estrutural e mecânica dos tecidos animais, outras biomoléculas da MEC são capazes de regular a dinâmica das próprias MECs e das células contidas nelas, incluindo a sobrevivência, proliferação e diferenciação celulares [75].

Matrizes que orquestram funções tão complexas nos tecidos *in vivo* ainda não podem ser reproduzidas *in vitro*. Ao invés disso, o principal papel das matrizes 3D *in vitro* é simplesmente dispor de um substrato com propriedades adesivas e estrutura 3D, isto é, um modelo simplificado de MEC, reconhecendo que muitas das propriedades das MECs dos tecidos não estarão presentes. Em qualquer modelo de cultivo 3D, diferentes microambientes da matriz podem influenciar substancialmente o resultado experimental. Por exemplo, o cultivo de células tumorais em matrizes 3D de colágeno pode ser iniciado a partir de células individualizadas, em pequenos agregados ou grandes agregados, resultando, respectivamente, em migração e invasão individual, invasão celular coletiva ou um composto de células migratórias e células necróticas [76,

77]. O motivo de serem observadas células necróticas nos cultivos com grandes agregados celulares é a impossibilidade de difusão de oxigênio, nutrientes e excretas em região tão densa e desprovida de vascularização. Conseqüentemente, à medida que o modelo de cultivo torna-se maior e/ou mais denso, limitações no transporte de macromoléculas por difusão torna-se um fator limitante na sobrevivência e homeostase celular. Apesar destas restrições nutricionais serem mais parecidas com o que ocorre em tecidos *in vivo* e microambientes tumorais do que a difusão uniforme e rica em oxigênio das culturas 2D com monocamadas de células, elas também introduzem variáveis significativas e incontrolláveis no modelo 3D, uma vez que os microambientes em diferentes profundidades da matriz podem apresentar estados nutricionais e respostas celulares distintas [78, 79]. Por isto, para a maioria dos estudos *in vitro* com explantes de tecidos, o fragmento de cultivo não deve ter dimensões superiores a 0,3 mm. Ainda que as matrizes protéicas fabricadas em laboratório costumem apresentar maior capacidade de difusão do que explantes de tecidos, não é indicado o desenvolvimento de matrizes com dimensões superiores a essa.

Diversos tipos de matrizes simples (com apenas um componente molecular), de origem natural ou sintética, foram desenvolvidos, sendo aqueles compostos por colágeno do tipo I os mais comumente empregados. Os colágenos do tipo I utilizados na preparação de matrizes 3D para cultivo de células geralmente são derivados dos tendões de rabos de rato [19, 21, 80] ou de cartilagens bovinas [81, 82]. A purificação é normalmente realizada por digestão ácida, e o colágeno gelifica sob pH neutro e temperatura de 37°C, em densidade que usualmente varia de 1,5 a 30 mg/mL. Há relatos de géis com densidades inferiores a 1,5 mg/mL, mas em geral colágenos puros não gelificam em densidades abaixo deste limite.

Se comparados aos tecidos naturais, as matrizes colágenas são menos densas, mais hidratadas e mecanicamente mais frágeis (tabelas 1 e 2). Géis deste gênero já foram utilizados em uma série de estudos, com diversos tipos celulares, tais como contração e migração de fibroblastos [19, 21, 80, 83, 84], invasão e contração de células tumorais [80, 81, 85, 86], angiogênese [87, 88], vasculogênese [89, 90], formação de dutos glandulares epiteliais [91, 92], migração de células do sistema imune [93, 94, 95, 96], e muitas outras.

O tamanho dos poros e o diâmetro das fibras de colágeno podem ser manipulados com alterações na concentração ou pH durante o processo de gelificação,

Tabela 1: Valores típicos de algumas propriedades de MECs *in vitro* e *in vivo*. Adaptação de Pedersen e Swartz, 2005.

	Gel de colágeno reconstituído	Gel de fibrina reconstituída	Pele	Fígado	Pulmão	Carcinoma mamário
Densidade de proteínas (mg/mL)	0,3-30 (colágeno puro)	1,5-2,2 (fibrina pura)	200-300*	9,2 (sendo 5,5 apenas colágeno)	180*	Variável, porém alta
Água (%)	99	99	70-80	20	82	50-80
Outras proteínas da MEC	Não há	Não há	Elastina (2-4%), proteoglicanas (0,1%), etc.	Variável	Elastina (5%)	Variável
Referências	160, 163, 123, 158	167, 4	4, 164, 126, 180	161	153	103

* Computado a partir da percentagem de água, considerando uma densidade tecidual de 1 g/mL.

Tabela adaptada de Pedersen e Swartz, 2005.

Tabela 2: Propriedades mecânicas típicas de matrizes 3D de colágeno e fibrina.

	Gel de colágeno reconstituído	Gel reconstituído de fibrina
Densidade de proteínas (mg/mL)	0,3-30 [160,163]	1,5-2,2 [167]
Diâmetro das fibras protéicas (nm)	30-300 [30], 90-400 [2], 200-350 [69], 320-800 [24], 392-500 [160],	4-500 [4], 44-150 [167], 110-160 [189], 110-260 [20]
Diâmetro dos poros da matriz (µm)	1-10 [4, 118, 169]	0,5-11 [189], 0,1-10 [4]
Módulo de cisalhamento de armazenagem (Pa)	0,15-50 [13, 114, 118]	150-520 [10,29]
Módulo de cisalhamento de perda (Pa)	0,02-8 [13, 114, 118]	30 [29]
Módulo de Elasticidade (kPa)	1-33 [160]	31-112 [140, 165]

Tabela adaptada de Pedersen e Swartz, 2005.

apesar das alterações em pH serem limitadas quando se adicionam células à solução [97]. Quando a solução de colágeno gelifica, os monômeros de colágeno condensam e se associam lateralmente formando fibras. Entretanto, a formação da matriz com característica de gel não ocorre via ligações covalentes entre as fibras mas apenas pelo entrelaçamento destas [98]. O entrelaçamento por ligações covalentes pode ser realizado pelo emprego de vários *crosslinkers*, principalmente glutaraldeído [99, 100, 101, 102, 103]. Entretanto, todos os agentes utilizados apresentam deficiências que evitaram o emprego em maior escala, como por exemplo o fato de glutaraldeído ser tóxico tanto *in vitro* quanto *in vivo* [104, 105], ou o tempo de *crosslinking* por açúcares redutores demorar semanas [103]. Os géis de colágeno do tipo I são, portanto, mecanicamente frágeis, mas biologicamente compatíveis e servem como ambiente *in vitro* para estudos de curto prazo ou como arcabouços a serem remodelados por células em estudos mais longos.

De certa forma, é surpreendente a larga escala de valores observados para os diâmetros das fibras e o tamanho das malhas dos géis de colágeno (tabela 2). Estas características são determinantes tanto para a arquitetura da matriz quanto para o comportamento da células cultivadas dentro delas. Entre as razões para estas diferenças podemos citar (1) os métodos utilizados para fazer as medições, que podem apresentar artefatos de técnica e (2) o fato da arquitetura da matriz ser bastante dependente da pureza e condições de gelificação (como, temperatura, pH, força iônica, tempo, etc.). Muitas medições foram realizadas por meio de microscopias eletrônicas, que podem gerar resoluções na escala nanométrica. Contudo, os processos de fixação e desidratação das amostras podem colapsar a malha protéica, que é sempre altamente hidratada, diminuindo a distância entre as fibras. Além disso, em matrizes de colágeno o diâmetro das fibras e o espaçamento entre elas depende da concentração de colágeno assim como do pH e força iônica da solução a ser gelificada [106]. Por exemplo, utilizando-se valores de pH na faixa de 6,0 a 9,0 pode-se formar fibras com diâmetros de 500 a 392 nm (o diâmetro diminui com o aumento do pH), enquanto o aumento da concentração de colágeno aumenta também a densidade das fibras mas não afeta significativamente o diâmetro delas [97]. Em relação ao espaçamento entre as fibras, cálculos teóricos estimam a distância entre fibras na ordem de 5 a 10 μm , enquanto em estudos de difusão as estimativas são menores em uma ordem de grandeza ($\sim 1 \mu\text{m}$) [107]. Curiosamente, cálculos teóricos estimam que a distância máxima entre fibras é apenas fracamente

dependente da concentração de colágeno; a distância máxima seria proporcional a $1/\sqrt{[\text{colágeno}]}$ [107]. Claramente, são necessários mais estudos para se definir com clareza o espaçamento entre fibras em matrizes 3D de colágeno sem a interferência de artefatos de técnica, apesar dos dados sugerirem que o tamanho dos poros deve estar na ordem de alguns poucos micrômetros.

As propriedades mecânicas de tecidos fibrosos dependem tanto da arquitetura, ou disposição espacial, das fibras que compõem o tecido, quanto da força delas. A tensão exercida sobre muitos tecidos com MEC densa e organizada é dissipada inicialmente pela perda de organização das fibras (por exemplo, fibras organizadas aleatoriamente tornam-se alinhadas no sentido da tensão exercida), mas quando a entropia organizacional é consumida a tensão deve ser suportada pela força das fibras (determinada pelas ligações intra- e intermoleculares das fibras), até que estas sejam rotas [108]. Em tecidos *in vivo* a organização fibrilar é adaptada às cargas fisiológicas comuns a cada tecido com capacidade de resposta específica a funções biomecânicas. Nos tendões, por exemplo, as fibras colágenas se organizam em feixes paralelos à direção das tensões exercidas sobre eles, de modo que a resistência do tecido se deve quase que exclusivamente à força conjunta das fibras (a entropia organizacional do tecido é mínima). Na pele, por outro lado, as fibras de colágeno e elastina são orientadas aleatoriamente, de modo que a resistência do tecido é exercida, preponderantemente, pela perda de entropia organizacional do tecido [108].

Curiosamente, enquanto a tensão em tecidos *in vivo* induz um comportamento mecânico entálpico, em matrizes reconstituídas o comportamento é entrópico. Isto porque em matrizes 3D de colágeno a resposta mecânica à tensão decorre, principalmente, (1) da dinâmica de fluidez da água contida no gel e (2) da reorganização de arquitetura fibrilar que não apresenta ligações intermoleculares fortes. Como a fração sólida dos géis de colágeno é mínima, cerca de 99% da massa consiste de fase líquida [109], e as interações intermoleculares não são covalentes [98], as propriedades mecânicas do gel são geralmente independentes da força das fibras. A densidade, organização e taxa de entrelaçamento das fibras colágenas determinam a porosidade da matriz que, por sua vez, responde pela facilidade de movimento intersticial dos fluidos no gel. Assim, a fluidez (entrada e saída de água do gel) responde em grande parte pelas deformações da matriz. Além disso, a resistência à tensão dos géis se deve muito mais ao rearranjo macromolecular, por dobras e deslizamentos das fibras colágenas, do que

por resistência individual ou coletiva das fibras [110, 111]. Como a fase líquida dos géis é extremamente alta e a mobilidade dos fluidos na matriz é muito grande, a resistência a tensão e compressão dos géis de colágeno do tipo I é bastante baixa.

Por outro lado, quando as células estão presentes no interior dos géis, a tensão sobre as matrizes 3D de colágeno costumam levar ao alinhamento das fibras, uma vez que as células atuam como pontes entre as fibras entrelaçadas, tornando estas fisicamente interligadas. Neste caso, a maior tensão exercida sobre estes géis advém das próprias células, cujo efeito torna as matrizes mais compactas a medida que a rede fibrilar concentra-se. Ainda assim, como comentado acima, a resistência à tensão dos géis de colágeno com células é bem pequena, porque as fibras estão apenas entrelaçadas no gel e não interligadas por ligações covalentes [98]. Além disso, fibras reconstituídas de colágeno são muito menos resistentes à tensão do que suas similares *in vivo*; enquanto as fibras reconstituídas são rotas com tensões de 10kPa, as fibras *in vivo* podem resistir até 1000 Mpa de carga [97].

Portanto, a dissipação da tensão nas matrizes 3D de colágeno é função, principalmente, da dinâmica de seus fluidos e da liberdade de movimento das fibras colágenas. Isto significa que os estresses mecânicos impostos sobre os géis induzem a formação de deformações não uniformes na matriz 3D; fato este com implicações importantes nas respostas celulares observadas em ambientes 3D, quando comparados a cultivos 2D. As células aderidas a superfícies 2D geralmente não experimentam diferenças entre tensões locais e globais porque a maioria destes substratos são rígidos e não se deformam com as forças exercidas pelas células. Já em substratos 3D, geralmente as forças exercidas pelas células são capazes de deformar o substrato, causando impactos locais (nas fibras às quais a célula está aderida) e globais (em toda a matriz), que influenciam não só a própria célula e aquelas imediatamente a sua volta mas, potencialmente, todas as células da matriz 3D, como será revisto a seguir.

1.4. Remodelamento de matrizes 3D de colágeno por fibroblastos

Uma importante característica observada em culturas em géis de colágeno é que estes podem ser fisicamente reorganizados por fibroblastos. O processo de remodelamento da MEC, que não pode ser observado em cultivos com monocamadas

de células, resulta em dois processos os quais neste momento chamaremos de remodelamento local e remodelamento global. Estes dois processos encontram-se intimamente interligados e exercem efeitos semelhantes, porém em escalas distintas.

O remodelamento local diz respeito ao rearranjo das moléculas da MEC imediatamente a volta das células contidas em uma matriz 3D. No caso de géis de colágeno, por exemplo, as fibras tornam-se paralelas entre si em função de forças tracionais realizadas pelas células [112, 113, 114, 115]. O remodelamento local pode ainda ser decorrente de proteólise local por enzimas secretadas ou associadas à membrana das células [116, 117].

O remodelamento global, por outro lado, diz respeito ao processo de contração da MEC como um todo, pela atividade celular, resultando em diminuição do volume da matriz. *In vitro*, o fenômeno de remodelamento global é observado pela contração de géis de colágeno contendo células [19, 21, 81, 82] que pode chegar a menos de 95% do volume original em 24 horas [39]. Como será observado em maiores detalhes a frente, a força que induz a contração das matrizes envolve o citoesqueleto de acto-miosina e/ou o fenômeno de *ruffling* de membrana [21, 30, 98, 118, 119]. O presente trabalho tem como foco de estudo o que foi chamado de remodelamento global e, por simplificação, doravante considera o termo “remodelamento” sinônimo de “contração”, seja de uma MEC *in vivo* ou de um gel de colágeno *in vitro*. Portanto, quando empregado o termo “remodelamento” ele será referente ao processo de remodelamento global, e não ao de remodelamento local.

A devida atenção ao fenômeno de remodelamento de MEC foi dada somente a partir da década de 1970, com o estudo pioneiro de Elsdale e Bard [19] seguido daqueles desenvolvidos pelo laboratório de Eugene Bell [21]. Bell tinha objetivos muito claros ao estudar tal fenômeno: ele objetivava entender o processo de cicatrização de injúrias na pele, processo no qual o remodelamento tem papel fundamental. Ocorre que o reparo de injúrias na pele que atingem o tecido conjuntivo envolve três processos: contração, deposição de tecido conjuntivo e re-epitelização. A contribuição de cada processo varia de acordo com a extensão, localização e espécie animal lesada mas, em geral, a contração diminui a área da lesão aproximando suas margens, a deposição de tecido conjuntivo resulta em reposição da derme, e a re-epitelização resulta em fechamento da lesão ao meio extra-corpóreo pela formação da epiderme [120]. A contração, ou remodelamento, do sítio lesionado foi descrito como sendo função da

atividade de células chamadas miofibroblastos, cuja principal característica é sua alta atividade contrátil [17, 121]. A relação entre reparo tecidual e remodelamento é exemplificado ainda por células provenientes de pacientes com trombostenia de Glanzmann. Os pacientes com esta desordem exibem reparo tecidual deficiente [122], e fibroblastos extraídos de pacientes com a doença são incapazes de contrair coágulos de fibrina [123] e remodelam géis de colágeno de modo bastante ineficiente [80], sugerindo que a habilidade de remodelamento de MEC pelas células está diretamente relacionada a capacidade de reparo tecidual *in vivo*.

Estudos iniciados na década de 1950 já sugeriam que as células que compunham o tecido conjuntivo eram aquelas responsáveis pela geração de forças durante a contração de lesões [14]. Outros estudos mostraram que as células com capacidade contrátil localizavam-se principalmente na margem das lesões [16] até que Gabbiani e colaboradores, em 1972 [17], denominaram estas células de “mio-fibroblastos” (do inglês, *myo-fibroblasts*). A análise subsequente de marcadores moleculares mostraram que apesar dos miofibroblastos apresentarem α -actina de músculo liso, estas células eram descendentes de fibroblastos da derme, e não de células de músculo liso [124, 125] por processo de diferenciação que precedia, ou ocorria conjuntamente, com a contração da lesão [124, 126]. De todo modo, ao menos em parte a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos parece ser positivamente regulada quanto maior é a resistência da lesão ao processo de contração. Além disso, sugeriu-se que a força exercida por fibroblastos em migração na margem das lesões poderia ser suficiente para iniciar o processo de contração [124, 126]. Assim, acredita-se que fibroblastos migratórios iniciam o processo de contração e, a medida que a resistência da lesão aumenta, estas células se diferenciam em miofibroblastos cujos microfilamentos tornam-se organizados em fibras alinhadas ao eixo de maior resistência aumentando ainda mais a tensão sobre o tecido [127].

Apesar da maior parte dos trabalhos de remodelamento de matrizes de colágeno terem sido realizados com o emprego de fibroblastos, diferentes linhagens destas células apresentam capacidades distintas de contração. Uma observação intrigante é a de que fibroblastos recém-isolados remodelam matrizes mais efetivamente do que linhagens estabelecidas de fibroblastos que, por sua vez, remodelam matrizes melhor do que fibroblastos transformados [80, 86]. Além disso, outros tipos celulares tais como células endoteliais, epiteliais, ósseas e mesenquimais, também podem apresentar capacidade de

remodelar matrizes de colágeno. Diferentemente de fibroblastos, células endoteliais e epiteliais aderem *in vivo* à MEC principalmente através de seu domínio basal (à membrana basal, mais especificamente), e não ficam envoltas por matriz como no modelo de cultivo em géis de colágeno. Ainda assim, o remodelamento de matriz apresentado por estas células pode apresentar papel relevante durante o desenvolvimento embrionário. Por exemplo, quando cultivados em matrizes 3D ambos os tipos celulares foram capazes de realizar *branching morphogenesis* (formação de estruturas ramificadas) tal como ocorre com capilares e tecidos glandulares [128, 129, 130, 131]. Outros tipos celulares, como neutrófilos e linfócitos, migram pela matriz sem induzir sua contração [96, 132, 133], enquanto tantas outras células modificam a matriz por proteólise [116, 134].

Outra ressalva importante diz respeito à composição da matriz empregada. O tecido conjuntivo *in vivo* é extremamente complexo e contém, para ficar apenas no plano estrutural, muito tipos de colágeno, elastina, outras glicoproteínas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas. Além disso, durante o processo de cicatrização forma-se uma matriz de fibrina/fibronectina na região lesada que eventualmente é substituída. Esta diversidade de componentes de MEC pode ser combinada e polimerizada de diversas formas, acarretando em matrizes com propriedades químicas e físicas variadas [97, 103, 108, 135, 136, 137]. Certas modificações podem estimular o processo de remodelamento por fibroblastos, como por exemplo a adição de fibronectina à matriz [138, 139, 140], ou pode inibi-lo, como pela adição de tenascina-C em matrizes de fibrina [141].

As bases moleculares para tais variações são pouco compreendidas, mas certamente envolvem a ativação de diferentes vias de sinalização por receptores de membrana dos fibroblastos. Por exemplo, o remodelamento de géis compostos por colágeno e glicosaminoglicanos se mostrou dependente de integrinas do tipo $\alpha_5\beta_1$ [142], apesar desta integrina não ser necessária no remodelamento de matrizes compostas apenas por colágeno [143, 144]. Neste caso (géis compostos apenas de colágeno), uma série de outras integrinas podem participar do processo tais como $\alpha_1\beta_1$ [145], $\alpha_2\beta_1$ [146, 147], $\alpha_{11}\beta_1$ [148] e $\alpha_v\beta_3$ [149].

1.4.1. Modelos de remodelamento *in vitro*

Há vários modelos de remodelamento de MEC *in vitro* que, em grande parte, são decorrentes de estudos focados na elucidação do processo de contração de lesões cutâneas. Bell e colaboradores (1979) introduziram os modelos de *floating matrix contraction* (FMC), o qual chamou de “*collagen lattice contraction*”, e de *anchored matrix contraction* (AMC) [21]. Um terceiro modelo, *stress-relaxed matrix contraction* ou *stressed matrix contraction* (SMC), com características de ambos os modelos FMC e AMC foi desenvolvido posteriormente e inicialmente chamado de “*stress relaxation*” [150].

A figura 4 ilustra as três variações comumente encontradas na literatura científica. Cada modelo apresenta características mecânicas próprias. No caso do modelo FMC a distribuição de forças no interior do gel é isotrópica, isto é, igual ou semelhante em todas as direções. Neste caso, a tensão sobre todas as células contidas na matriz é semelhante e o gel contrai tanto em altura quanto no seu diâmetro. Em contraposição, no modelo AMC a tensão é dita anisotrópica, isto é, varia de acordo com a direção, uma vez que uma região do gel encontra-se presa ao substrato. Neste modelo a matriz contrai apenas na sua altura. Dessa forma, matrizes contraídas pelo método FMC, apesar de compactas, apresentam como característica mecânica o relaxamento e complacência (baixa tensão mecânica interna), enquanto as matrizes contraídas pelo método AMC apresentam-se como tecidos rijos (detentores de alta tensão mecânica interna). Por fim, no modelo SMC desenvolve-se uma tensão na matriz, no período em que ela se encontra presa ao substrato, igual àquela observada no modelo AMC. Em seguida, o gel é solto do substrato, e a tensão interna é dissipada. Independentemente do modelo, contudo, o fim do processo de contração ocorre quando há o desenvolvimento da chamada “tensão isométrica” nas células, uma situação na qual a tensão mecânica interna e externa à célula se contrabalanceiam. Em outras palavras, a contração exercida pela célula é resistida com igual força pela MEC.

Estes três modelos foram desenvolvidos de modo a representarem fenômenos observados durante o fenômeno de contração de lesões *in vivo*. O modelo FMC leva a formação de um tecido parecido com uma derme saudável, daí a denominação de “equivalente dermal”, onde a tensão entre fibroblasto e MEC é isométrica e as células se encontram em estado de baixa proliferação e deposição de MEC (comentado em maior

profundidade adiante). Já o modelo AMC foi criado com vistas a tentar observar o que ocorre durante o processo de contração de tecidos lesados, uma vez que nestes ocorre uma tensão anisotrópica decorrente da inexistência de epiderme, e as células tornam-se ativadas: proliferam, migram e depõem MEC. Por fim, o modelo SMC pretende refletir o processo de readaptação do tecido contraído durante o processo de cicatrização para um tecido saudável de baixa tensão interna (figura 4).

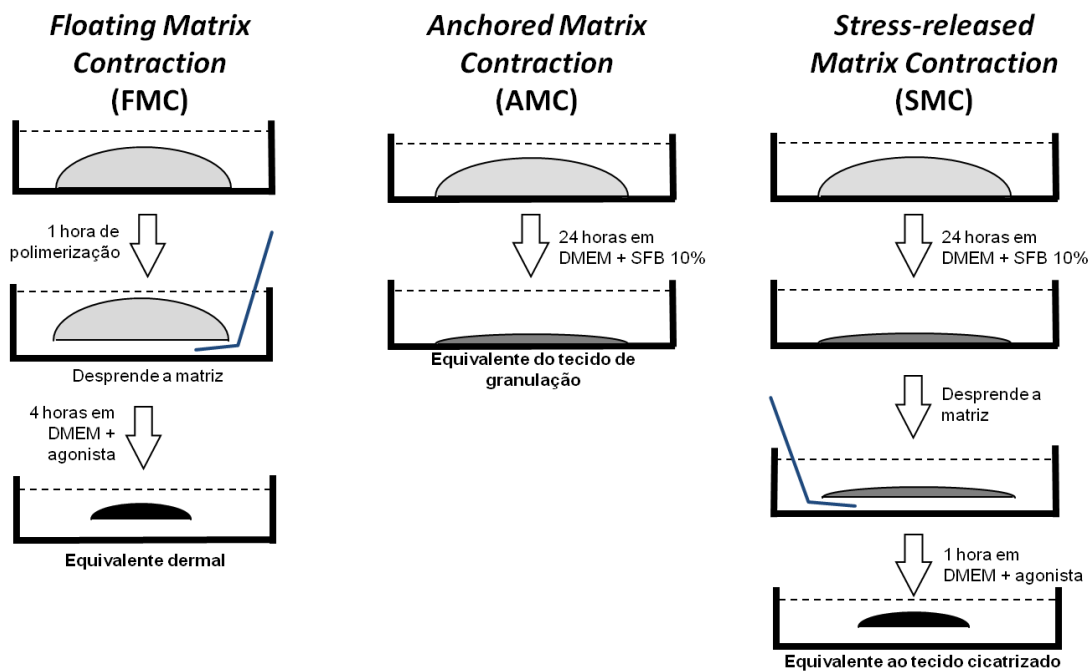


Figura 4. Modelos FMC, AMC e SMC de remodelamento de matriz de colágeno.

1.4.2. Mecanismos *in vitro* de remodelamento de MEC por fibroblastos

As evidências científicas sugerem que os mecanismos moleculares responsáveis por desencadear o fenômeno de remodelamento nos diferentes modelos de contração de géis de colágeno são, pelo menos, semelhantes. Contudo, há mecanismos moleculares distintos envolvidos no remodelamento de MEC pelas células. Além disso, há diferenças na relevância de cada mecanismo em cada modelo de contração *in vitro*, tanto no plano funcional quanto no curso temporal do remodelamento.

Em 1981, Harris e colaboradores propuseram que o processo de contração dos tecidos deveria ser consequência da atividade migratória das células que o compunham

[83]. Os pesquisadores denominaram este fenômeno de remodelamento tracional (em inglês, “*tractional remodeling*”) para diferenciar de contrações semelhantes àquelas observadas em células de músculo liso. Segundo a tese proposta, a contração ocorreria primordialmente pelo espalhamento celular e alongamento de projeções citoplasmáticas, e não pela retração de prolongamentos já formados [82, 151, 152]. Desta forma, células migratórias reorganizariam as fibrilas de colágeno a sua volta [82, 153, 154] e, subseqüentemente, o resto da matriz, uma vez que as forças tracionais seriam propagadas por toda a rede interconectada de fibrilas de colágeno [155].

De fato, uma correlação direta entre os fenômenos de remodelamento de MEC e migração de fibroblastos foi proposto baseado em novas evidências por Ehrlich e Rajaratnam [156]. Por outro lado, os mesmos autores mostraram que miofibroblastos apresentam capacidade contrátil sem necessariamente se locomoverem. Em seguida, muitas outras publicações apresentaram linhas de evidência que demonstravam uma relação direta entre os fenômenos de remodelamento e migração [157, 158, 159, 160, 161]. Além disso, se mostrou que mecanismos moleculares muito parecidos regulavam ambos os processos. Por exemplo, a contração de matrizes de colágeno pelos modelos AMC e SMC se mostrou ser dependente de mecanismos próprios da migração celular como: a adesão ao colágeno via integrina $\alpha_2\beta_1$ [143, 146, 147, 162], a atividade de miosina II [163, 164], a formação de complexos semelhantes a adesões focais, chamados junções fibronexus, e a formação de fibras de tensão [21, 98, 118, 139, 165, 166]. Outras integrinas também foram eventualmente descritas como participantes do processo de remodelamento: $\alpha_1\beta_1$ [145], $\alpha_{11}\beta_1$ [148] e $\alpha_v\beta_3$ [149].

Todavia, a capacidade de remodelamento de matrizes de colágeno por fibroblastos é relativamente baixa se não for induzida por um agonista extracelular. Os trabalhos originais com remodelamento foram desenvolvidos na presença de frações de soro animal [19, 21] que, subseqüentemente, se mostrou ser um pré-requisito para a contração das matrizes [80, 98]. Hoje se sabe que a atividade contrátil induzida pelo soro pode ser substituída ou aumentada por fatores de crescimento purificados. O fator de crescimento transformador β (TGF- β) foi o primeiro descrito como indutor da contração tanto de matrizes flutuantes quanto ancoradas [167, 168, 169]. Não por coincidência, TGF- β também é um indutor de diferenciação em miofibroblastos [170, 171]. Entretanto, a diferenciação em miofibroblastos induzida por TGF- β também parece ser dependente da formação de junções fibronexus [121, 172]. Como apenas

fibroblastos cultivados em matrizes ancoradas, e não em flutuantes, desenvolvem estas junções, a característica mecânica da MEC também parece regular a diferenciação ou regressão de miofibroblastos [173, 174].

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) também estimula a contração de géis de colágeno [143, 175], porém apenas nos modelos FMC e AMC. Além disso, o mecanismo de ação do PDGF é distinto e independente do mecanismo induzido por TGF- β [175, 176]. Outros fatores que estimulam remodelamento de matriz, ainda que por vias de sinalização e em modelos distintos, incluem ácido lisofosfatídico (LPA) [177], fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) [165], fator de crescimento epidermal (EGF) [178], trombospondina-1 [179] e IGF-1 [159, 180]. Todavia, a regulação do remodelamento por bFGF parece ser mais complexa, uma vez que foi descrito como potencial indutor ou inibidor do fenômeno dependendo da dose empregada [167]. Há também biomoléculas que inibem o remodelamento de matrizes 3D de colágeno por fibroblastos, como bFGF em altas doses [167], fator de crescimento de fibroblastos ácido (aFGF) [181], interleucina-1beta [182], gama-interferon [183] e prostaglandina E2 [161, 184]. A tabela 3 faz um resumo das biomoléculas descritas na literatura como reguladoras do remodelamento *in vitro* de matrizes 3D de colágeno por fibroblastos.

Dentre os fatores de crescimento que promovem a contração de matrizes 3D de colágeno, observa-se que há uma especificidade de ação entre o agonista empregado e o modelo de remodelamento utilizado. Por exemplo, SFB, TGF- β e LPA podem induzir a contração tanto de matrizes flutuantes (modelo FMC) quanto daquelas ancoradas (modelo AMC) ou soltas após estresse (modelo SMC) [185]. O tratamento com PDGF, por outro lado, só leva à contração de matrizes flutuantes ou ancoradas. Em correspondência com estas observações, as vias de sinalização disparadas também são distintas dependendo do conjunto agonista/modelo empregado. Hoje se conhecem algumas vias, ainda incompletas, que estão associadas ao processo de remodelamento de matrizes 3D de colágeno induzidas por fatores de crescimento em matrizes flutuantes (figura 5). Duas delas são dependentes de Rho mas, aparentemente, são disparadas por agonistas distintos: uma somente por LPA e outra por PDGF (e bFGF). Por outro lado, há outras duas vias, uma disparada por PDGF e outra por LPA, que convergem na ativação de quinase ativada por p21 (PAK1).

Tabela 3: Efeito de diversos fatores extracelulares sobre a contração de géis de colágeno por fibroblastos.

	Contração de géis de colágeno por fibroblastos			Referências
	FMC	AMC	SMC	
LPA	++	Não há dados	++	[177, 186]
PDGF-bb	++	+	+ / 0	[143, 175, 186]
Soro Fetal Bovino	++	+	++	[82, 186]
Soro Humano	++	Não há dados	+	[186]
IGF-1	+	Não há dados	Não há dados	[159]
S1P	+	Não há dados	+	[186]
TGF- β	+	+	0	[167, 168, 169, 186]
Trombospondina-1	+	Não há dados	Não há dados	[179]
Endotelina-1	+ / 0	Não há dados	+	[186]
bFGF	+ (- em alta concentração)	Não há dados	0	[165, 167, 186]
aFGF	-	Não há dados	Não há dados	[181]
EGF	-	Não há dados	0	[178, 186]
Interferon- γ	-	Não há dados	Não há dados	[183]
Interleucina-1 β	-	Não há dados	Não há dados	[182]
Prostaglandina E2	-	Não há dados	Não há dados	[161, 184]

++ : potente indutor da contração; + : indutor da contração; 0 : ineficaz na contração; - : inibidor da contração.

Durante o processo de migração, as células aderentes também se utilizam de mecanismos de protrusão de membrana para translocar-se sobre um substrato. Um destes mecanismos se chama *ruffling* de membrana e caracteriza-se por uma grande dinâmica de microfilamentos que formam ondulações nas extremidades das protrusões celulares [187, 188]. Não deixa de ser inesperado, entretanto, que recentemente tenha se demonstrado que a inibição da formação de *rufflings* de membrana em fibroblastos bastam para evitar o remodelamento em modelos FMC [119]. O mecanismo de remodelamento via *ruffling* de membrana pode ser induzido por diferentes ligantes extracelulares, como PDGF e LPA. Os fatores de crescimento PDGF e LPA disparam vias de sinalização distintas (PI3K e proteína G_{ai} , respectivamente) em células cultivadas em matrizes flutuantes de colágeno [164, 185]. Estas vias convergem para PAK1 que indiretamente sinaliza para a formação de *rufflings* de membrana e contração

do gel de colágeno (figura 5). No entanto, Rac1 atua *upstream* de PAK1 [189] e também deve fazer parte desta via de sinalização.

As proteínas da família Rho de pequenas proteínas G são reguladoras da sinalização para miosinas associadas a microfilamentos, complexos estes responsáveis por gerar as forças de tração requeridas para a translocação celular [190, 191]. A inibição de Rho pela toxina botulínica C3 exotransferase previne o espalhamento celular e a formação de microfilamentos e adesões focais em células já aderidas [192, 193] assim como inibe a migração celular, tanto em cultivos 2D quanto em 3D [165, 194, 195]. Não surpreende, portanto, que a toxina botulínica também aja como inibidor da contração de matrizes, tanto flutuantes quanto ancoradas [185]. Curiosamente, as vias de sinalização intracelular *downstream* a Rho que sinalizam para a contração de géis flutuantes de colágeno variam de acordo com o fator de crescimento utilizado como agonista do fenômeno (figura 5) [119, 165]. Quando o fator utilizado para contrair géis flutuantes é o PDGF, o remodelamento pode ser inibido pelo reagente Y27632, um inibidor da Rho quinase, mas não por RNA interferencial (RNAi) para mDia1 [119]. O oposto ocorre quando se emprega LPA como agonista: o remodelamento é inibido por RNAi para mDia1 mas não por Y27632. Para remodelamentos estimulados por bFGF sabe-se que Rho quinase é essencial, mas não se testou a relevância da sinalização por mDia1 [165].

É importante notar que o mecanismo de remodelamento de matrizes flutuantes de colágeno por *ruffling* de membrana é independente daquele disparado por Rho e mDia, uma vez que tratamentos com Y27632 e RNAi para mDia não inibem a atividade de *ruffling* [119]. Deste modo, as sinalizações provenientes dos agonistas extracelulares PDGF e LPA induzem tanto os processos de remodelamento decorrentes dos complexos de microfilamentos e miosina II quanto da atividade de *ruffling* de membrana (figura 5).

Afora estas vias, observa-se ainda que a dinâmica de polimerização de microtúbulos pode afetar o remodelamento por fibroblastos. Foi observado, por exemplo, que o tratamento de cultivos de fibroblastos em matrizes flutuantes com nocodazol inibe completamente a capacidade de contração dos géis de colágeno, seja quando tratados com LPA ou com PDGF [196]. Por outro lado, fibroblastos cultivados pelo modelo SMC, os quais desenvolvem fibras de tensão, apresentam aumento na habilidade de contração dos géis quando tratados com nocodazol. Ainda não há descrição conclusiva da causa deste comportamento antagônico.

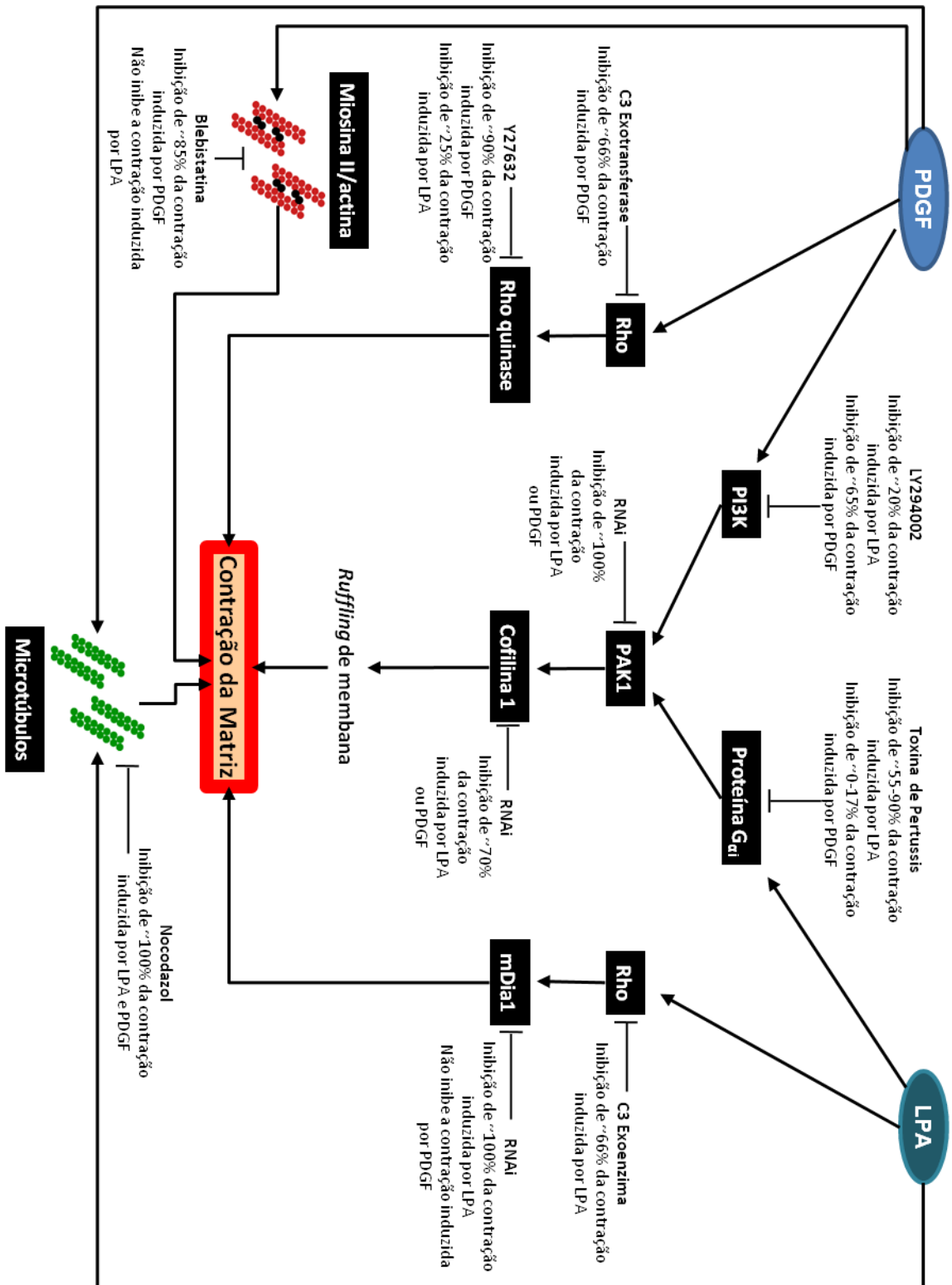


Figura 5. Modelo das vias de sinalização ativadas durante o processo de contração de matrizes flutuantes (FMC).

Mesmo que os mecanismos moleculares responsáveis pela contração dos géis de colágeno não sejam compreendidos por completo, sabe-se que as vias de sinalização disparadas em fibroblastos dependem, não apenas do agonista extracelular, mas também do estado mecânico da matriz. E mais, à medida que a tensão interna da matriz aumenta durante o processo de remodelamento, as vias de sinalização podem se adaptar ao novo estado. No caso de matrizes flutuantes tratadas por LPA, antes que a tensão isométrica se desenvolva o remodelamento das matrizes depende principalmente do mecanismo via *rufflings* de membrana, uma vez que a inibição da enzima Rho quinase em pouco ou nada altera a contração das matrizes [196]. Mas, uma vez desenvolvida a tensão interna da matriz (por exemplo, após 2 a 4 horas de contração), a continuidade do processo de remodelamento passa a ser dependente da atividade de Rho quinase, assim como da contração dependente de fosforilação de miosina II [196, 197, 198]. Curiosamente, a contração de matrizes flutuantes tratadas com PDGF é dependente de Rho quinase ao longo de todo o processo de remodelamento [196, 199] ainda que também sejam capazes de induzir o mecanismo de *ruffling* de membrana [119].

As vias de sinalização ativadas durante o processo de remodelamento pelo modelo SMC foram menos estudadas. No entanto, o fato de certos agonistas serem capazes de induzir o remodelamento nos modelos FMC e/ou AMC, mas não no modelo SMC (como o PDGF), demonstra que o conjunto das vias de sinalização que atuam em cada caso é distinto. Além disso, os dados disponíveis demonstram que as vias ativadas por um agonista no modelo FMC podem ser ativadas por agonistas distintos no modelo SMC. Por exemplo, a via Rho/Rho quinase não apresenta papel efetivo na contração de géis flutuantes induzida por LPA [119]. Contudo, no modelo SMC o tratamento com a toxina botulínica C3 exotransferase inibe em aproximadamente 66% a contração induzida por LPA [185], enquanto o inibidor de Rho quinase, Y27632, é capaz de inibir esta contração por completo [163]. Por outro lado, a toxina de Pertussis (inibidor de proteína $G_{\alpha i}$), que se mostra um potente inibidor da contração induzida por LPA no modelo FMC [119], não exerce efeito algum na contração induzida por LPA no modelo SMC [185]. Por fim, como comentado anteriormente, o efeito da despolimerização de microtúbulos pelo tratamento com nocodazol é dependente da presença ou não de fibras de tensão, mas no modelo FMC as células nunca apresentam estas estruturas enquanto no modelo SMC a presença das fibras de tensão depende do tempo de incubação com a

matriz ancorada. Portanto, a importância dos microtúbulos varia em função do modelo de remodelamento empregado.

Alguns estudos, contudo, demonstram que os processos de migração e contração não são diretamente correlacionados, ainda que ambos os processos sejam dependentes de mecanismos semelhantes dependentes de integrinas, microfilamentos e vias de sinalização como Rho/Rho quinase e Rho/mDia1. Por exemplo, condições que não exercem efeitos intensos sobre a migração de fibroblastos em matrizes 3D de colágeno, como a adição de LPA ou SFB ao meio de cultivo [200], induzem altas taxas de remodelamento [80, 177]. Além disso, a migração de fibroblastos em matrizes 3D é inibida por blebistatina, um inibidor da atividade de miosina II, mas não exerce nenhum efeito sobre a contração observada no modelo FMC quando estimulados por LPA [200]. Estas observações sugerem que a tese de Harris [83], de que a migração celular induz ao remodelamento de matriz, pode estar errada ou incompleta.

1.4.3. Fenótipo de fibroblastos em matrizes remodeladas

O fenótipo que se observa em fibroblastos cultivados em matrizes 3D flutuantes (no modelo FMC) é extremamente distinto daquele observado em cultivos com matrizes ancoradas (no modelo AMC) em função, principalmente, da variação mecânica observada em cada um destes modelos e a respectiva adaptação das células. A contração de géis flutuantes resulta em matrizes com baixa tensão mecânica interna e fibroblastos morfológicamente e fisiologicamente parecidos com o observado na derme *in vivo*. Por outro lado, a contração do gel ancorado acarreta no desenvolvimento de uma matriz com alta tensão mecânica interna, semelhante ao observado no tecido de granulação (tecido recém-formado e remodelado por miofibroblastos nos sítios de lesões). Corrobora com esta afirmativa o fato de medições das cargas mecânicas exercidas por fibroblastos demonstrarem que a força exercida sobre matrizes ancoradas é comparável àquelas geradas na contração de lesões da pele ou durante a erupção de dentes [201, 202, 203].

Em matrizes flutuantes, fibroblastos desenvolvem uma morfologia dendrítica, similar àquela observada em neurônios, caracterizada por processos citoplasmáticos longos, finos, ramificados, sustentados por microfilamentos e interconectados por

junções do tipo *gap* [21, 81, 204]. Estes dendritos (assim chamados em fibroblastos apenas pela semelhança morfológica com as estruturas homônimas de neurônios) em fibroblastos podem ter sua formação induzida pelo tratamento com PDGF e inibida quando estimulado por LPA [163] de maneira similar ao que ocorre em neurônios, cuja formação e retração também são regulados por estes agonistas e pela sinalização das pequenas proteínas G Rac e Rho [205, 206]. Assim, as morfologias observadas em fibroblastos cultivados no modelo FMC tratados com PDGF ou LPA são extremamente distintas entre si e também do observado em cultivos 2D (figura 6).

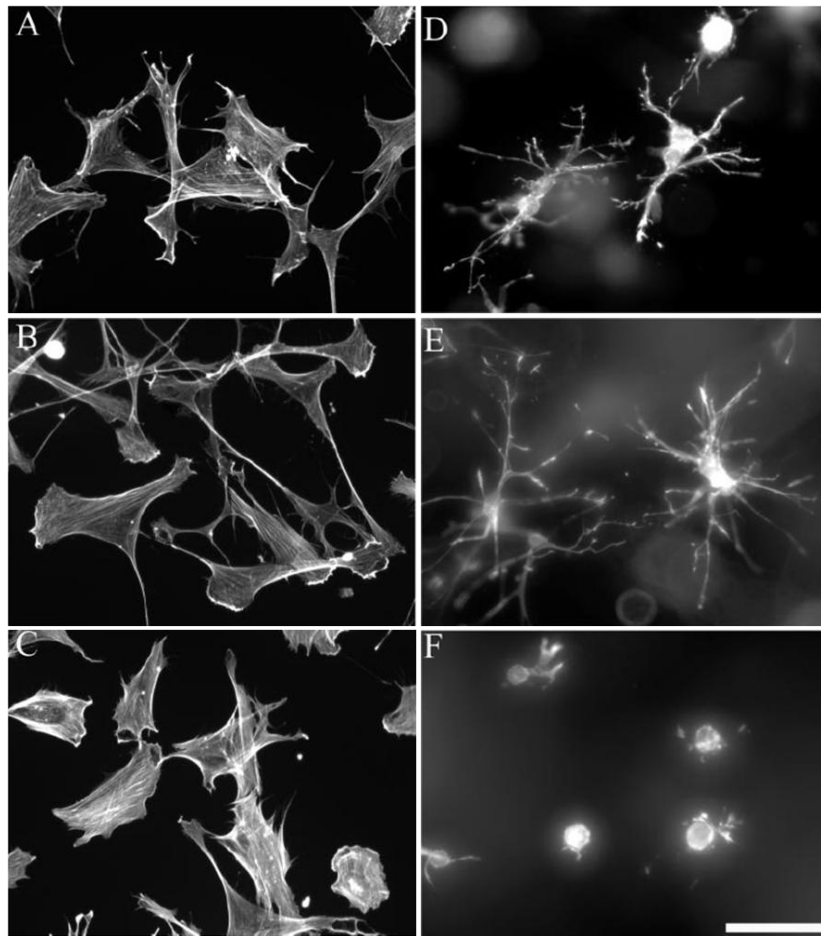


Figura 6. **A morfologia de fibroblastos varia em função do substrato e do agonista empregado.** Fibroblastos humanos cultivados em lamínulas de vidro recobertas com colágeno do tipo I apresentam muitas projeções de membrana do tipo lamelipódios e desenvolvem fibras de tensão, independentemente do tratamento com agonista (A-C). Já fibroblastos cultivados em matrizes 3D flutuantes de colágeno do tipo I projetam extensões de membrana semelhantes a dendritos (D-F). No entanto, estas projeções são afetadas pelo tratamento com agonista, ou seja, são induzidos na presença de PDGF (E) e são inibidos na presença de LPA (F). (A, D) representam fibroblastos em meio de cultivo com BSA; (B, E) representam fibroblastos em meio de cultivo com 5 mg/ml de BSA e 50 ng/mL PDGF; (C, F) representam fibroblastos em meio de cultivo com 5 mg/ml de BSA e LPA 10 μ M . Barra: 80 μ m. Figura adaptada de Grinnell et al., 2003.

Em contraste, as matrizes ancoradas oferecem resistência à contração exercida pelos fibroblastos e a estimulação, seja por LPA ou PDGF, torna as células bipolares e orientadas ao longo das linhas de tensão desenvolvidas nas fibras de colágeno de modo semelhante ao observado em cultivos sobre vidros e plásticos [118, 207]. Os microfilamentos das células se organizam em fibras de tensão associadas a junções fibronexus e os fibroblastos apresentam características de miofibroblastos [150, 208, 209]. Portanto, os fibroblastos podem remodelar matrizes *in vitro* sem que haja diferenciação em miofibroblastos, ainda que haja uma correlação entre a morfologia e fisiologia de ambos os tipos celulares em matrizes mecanicamente tensas (fibroblastos) e em injúrias *in vivo* (miofibroblastos).

Fibroblastos cultivados em matrizes flutuantes e ancoradas também apresentam profundas diferenças na capacidade proliferativa. Após o remodelamento de matrizes flutuantes e desenvolvimento de tensão isométrica, o número de células no gel regride [38], enquanto as células que permanecem entram em G_0 [210] e apresentam um rápido declínio na síntese de DNA, que pode chegar a 90% [39, 211, 212]. Ao menos em parte, a baixa capacidade de proliferação de fibroblastos cultivados em matrizes flutuantes parece ser reflexo da diminuição na capacidade destas células de responder a fatores de crescimento [39, 213, 214]. Por exemplo, foi demonstrado que fibroblastos cultivados em matrizes flutuantes perdem a capacidade de auto-fosforilação dos seus receptores de PDGF [215]. Todavia, o PDGF induz a contração de matrizes flutuantes pelos fibroblastos, demonstrando que os receptores de PDGF estão sujeitos a uma regulação complexa e ainda incompreendida em função da tensão mecânica do substrato.

Se fibroblastos cultivados em matrizes flutuantes diminuem em até 90% sua capacidade de síntese de DNA, células cultivadas em matrizes ancoradas continuam a sintetizar DNA e proliferar mesmo após estabelecida a tensão isométrica, ainda que em uma taxa até 50% menor que cultivos 2D [38, 39, 211, 215]. Da mesma forma, se uma matriz flutuante for sujeita a estímulo mecânico externo (por uma máquina associada às extremidades do gel) os fibroblastos respondem aumentando sua capacidade proliferativa [216]. Fibroblastos cultivados em matrizes flutuantes também apresentam baixa biossíntese de colágeno e aumento na secreção de colagenase, quando comparadas a células cultivadas em géis ancorados [168, 217, 218, 219], em virtude de mudanças em mecanismos tanto transcricionais quanto pós-transcricionais [220, 221, 222].

Se no modelo FMC de remodelamento os fibroblastos apresentam morfologia e fisiologia similar àquela observada na derme, enquanto no modelo AMC as células lembram o tecido de granulação em lesões, o modelo SMC representaria a transição entre o tecido de granulação e a derme neoformada, ainda que em uma escala de tempo extremamente menor do que o observado *in vivo* (figura 7). Por exemplo, em resposta ao relaxamento da tensão interna da matriz, quando desprende-se a matriz do substrato no modelo SMC, há o desaparecimento de fibras de tensão, a exocitose de vesículas contendo anexinas e actina [223], desassociação da fibronectina associada a membrana plasmática [150], inativação dos receptores de PDGF [215] e ativação de vias de sinalização como AMP cíclico/proteína quinase A [224, 225]. Assim como no modelo FMC, o relaxamento da tensão induz ainda uma rápida diminuição na síntese de colágeno e redução da proliferação celular tornando a célula quiescente [150, 226].

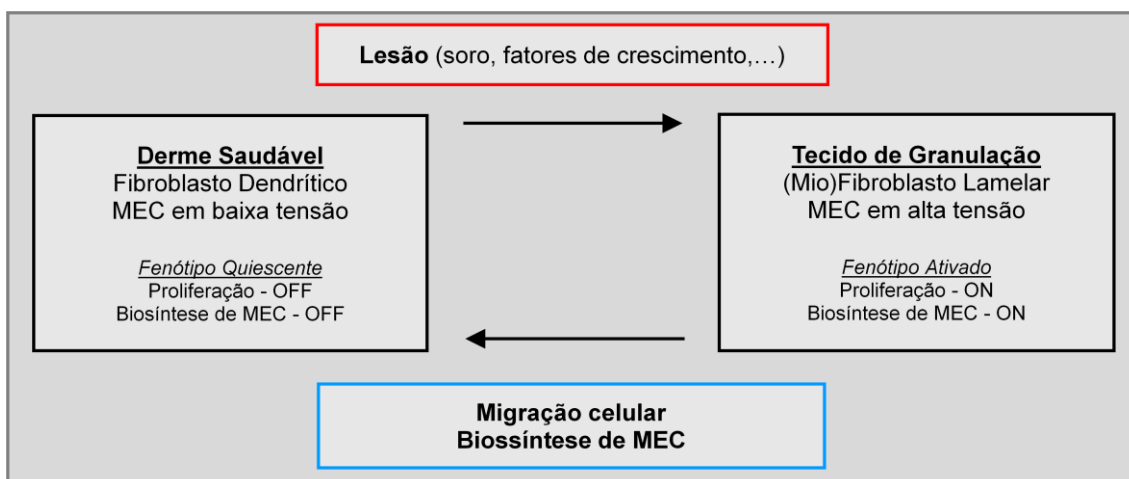


Figura 7. Os modelos de cultivo em matriz 3D FMC, AMC e SMC são representações de fenômenos que ocorrem durante a cicatrização tecidual *in vivo*. A derme saudável é caracterizada por apresentar MEC com baixa tensão mecânica e fibroblastos dendríticos e quiescentes. No modelo de matriz flutuante (FMC) estas características são reproduzidas. Quando a derme é lesada forma-se um coágulo sanguíneo seguido pelo aparecimento de um tecido de granulação com MEC de alta tensão mecânica e células com fenótipo de miofibroblastos ativados. As características marcantes deste tecido de granulação são reproduzidas no modelo de remodelamento em matriz ancorada (AMC). O tecido de granulação eventualmente evolui para um derme saudável recém-formada, principalmente pela deposição de nova MEC que leva à diminuição da tensão mecânica do tecido. Os miofibroblastos desaparecem e as células do novo tecido voltam a apresentar fenótipo quiescente. O modelo de *stress-relaxed matrix contraction* (SMC) pretende reproduzir este fenômeno, ainda que em uma escala de tempo muito reduzida em relação ao processo *in vivo*.

Portanto, as mudanças observadas na fisiologia dos fibroblastos após o relaxamento da tensão no modelo SMC, como diminuições da proliferação celular e síntese de MEC, são consistentes com o processo *in vivo* de transformação do tecido de granulação em uma derme normal (figura 7). Enquanto o tecido de granulação encontra-se sob alta tensão mecânica, a proliferação e biossíntese persistem. Entretanto, quando há o relaxamento da tensão no tecido, em geral por uma combinação de fechamento da lesão e deposição de nova MEC, as células adquirem um fenótipo não-proliferativo e os miofibroblastos desaparecem. Esta visão do processo de remodelamento em lesões também é consistente com a experiência médica e cirúrgica de que o incremento na tensão exercida sobre a pele induz a formação de tecido fibroso, como os quelóides [227, 228]. Além disso, também explica porque a aplicação de pressão externa reduz a extensão ou chance de aparecimento de contraturas nas lesões [229, 230].

1.4.4. Remodelamento de MEC por células transformadas

Em 1980, Bettie Steinberg e colaboradores realizaram estudos de remodelamento de matrizes de colágeno utilizando uma série de células em diversos estágios de transformação [80]. Entre as linhagens de células empregadas, havia aquelas de células pré-crise, imortalizadas, linhagens transformadas espontaneamente *in vitro*, e outras transformadas por infecção com vírus SV40. Os dados obtidos com fibroblastos murinos demonstraram que para contrair um gel de colágeno à metade de seu tamanho original em 24 horas são necessárias, em média, 6×10^3 células pré-crise, 58×10^3 células imortalizadas, 150×10^3 células espontaneamente transformadas e 160×10^3 células transformadas com SV40. Além disso, a inibição do antígeno T em fibroblastos transformados com SV40 voltava a aumentar a capacidade contrátil das células a um nível semelhante ao de células imortalizadas (em média, eram necessárias 52×10^3 células para contrair um gel de colágeno à metade de seu tamanho original em 24 horas). Experimento semelhante com fibroblastos humanos de origem cutânea ou pulmonar, também demonstraram que células em estágio pré-crise apresentavam capacidades de contrair géis de colágeno muito superiores a fibroblastos humanos transformados com SV40 (tabela 4). Em conjunto, os dados do trabalho mostram que há claras diferenças nas habilidades de fibroblastos em contrair géis de colágeno, porém

estas diferenças não são decorrentes da espécie de origem das células, mas refletiriam as diversidades fenotípicas entre células em diferentes estágios de transformação.

Tabela 4: **Habilidade de fibroblastos humanos em contrair géis de colágeno.**

	Linhagem das células	Tecido	NA_{1/2} x 10⁻³ *	Média ± Desvio Padrão #
Linhagens pré- crise	1379	Pulmão	9	8.8 ± 6.1
	1380	Pulmão	20	
	1381	Pele	10	
	189	Pele	5	
	301	Pele	2	
	167	Pele	7	
Transformados por vírus SV40	SV80	Pele	200	200 ± 0
	NG8	Pele	200	

* Número médio de células necessárias para reduzir a área do gel de colágeno à metade em 24 horas.

Média e desvio padrão do NA_{1/2} x 10⁻³ para cada grupo de linhagens celulares.

Tabela adaptada de Steinberg et al., 1980.

Mais dois trabalhos na literatura parecem corroborar com os resultados de Steinberg e colaboradores, ambos comparando fibroblastos com células de sarcomas de rato [81, 86]. No primeiro, desenvolvido por Bellows e colaboradores (1981), fibroblastos de ligamentos periodontais de macacos, fibroblastos de gengiva humana, células de calvária embrionária de ratos, células epiteliais de ligamentos periodontais porcinos e células de osteosarcoma 17/2 de ratos (ROS) foram incorporadas em matrizes 3D de colágeno e a capacidade de contração dos géis por cada tipo celular foi analisada [81]. Em um período de 72 horas de análise somente a linhagem ROS, também a única linhagem de células transformadas estudada, foi incapaz de contrair os géis de colágeno. Segundo os autores, estas células também apresentaram uma morfologia na matriz 3D bastante distinta dos demais tipos celulares: elas se espalhavam muito pouco sobre o gel e também não estendiam processos citoplasmáticos entre as fibras colágenas. No segundo trabalho, a capacidade de contrair matrizes de colágeno foi comparada entre fibroblastos de rato provenientes de derme normal ou de sarcoma [86]. A linhagem de células transformadas apresentou menor capacidade de contração dos géis no período de até 2 semanas de cultivo, quando finalmente os tamanhos dos géis se tornaram semelhantes àqueles contraídos por células normais. Contudo, ao final das 2 semanas de cultivo a densidade celular nos géis com células transformadas era 8 vezes superior àquela observada nos géis com fibroblastos normais,

sugerindo que foram necessárias mais células transformadas para gerar um efeito semelhante ao induzido por células normais.

Ainda que os três trabalhos descritos corroborem com a idéia de que a transformação celular inibe a habilidade das células de remodelar MEC, não há dados *in vivo* ou com linhagens primárias tumorais que demonstrem resultados semelhantes. Além disso, não se estabeleceram teorias que indiquem os mecanismos causais deste fenômeno nem que expliquem sua relevância na Biologia do Câncer.

1.5. Migração de fibroblastos sobre matrizes de colágeno

1.5.1. Migração sobre colágeno adsorvido em substratos 2D

Como amplamente comentado acima, os tipos de interações mecânicas que ocorrem entre células e substratos 2D são diferentes daqueles observados em matrizes 3D. Pelo fato da geometria e rigidez do substrato serem diferentes nos ambientes 2D e 3D, a morfologia e fisiologia celulares tornam-se também distintas. No caso da migração ou translocação celular, há diferenças e semelhanças no fenótipo de fibroblastos cultivados em substratos 2D e 3D. Em ambos os casos, as trações exercidas pela célula sobre o substrato são função de uma combinação de mecanismos que envolvem a ancoragem ao substrato, o *turn-over* destes pontos de adesão e a regulação da dinâmica de microfilamentos. Contudo, a resistência do substrato às forças exercidas pelas células, a qual pode ser bastante distinta entre substratos 2D e 3D, também apresenta papel crucial no translocamento celular. Pela coordenação destes eventos, incluindo ainda a magnitude das forças exercidas e as constantes de ligação das adesões da célula em diferentes regiões no plano da membrana plasmática, torna-se possível o fenômeno de migração celular em determinada direção.

Na década de 1970, por meio do desenvolvimento da técnica de microscopia de reflexão interferencial (*interference reflection microscopy*, ou IRM, em inglês) se observou que células humanas aderidas sobre superfícies 2D rígidas estabelecem pontos discretos de contato com a MEC nos quais a membrana plasmática fica a menos de 30nm de distância do substrato [231, 232]. Estes pontos de adesão são os principais

responsáveis pela migração celular observada sobre proteínas de MEC. Estas adesões são formadas pela associação da MEC a receptores do tipo integrinas, os quais tornam-se ativados e agrupam-se na membrana plasmática. Os domínios citoplasmáticos das integrinas podem recrutar então um conjunto de mais de 100 proteínas estruturais e sinalizadoras em complexos protéicos que fazem tanto transdução de sinais ao núcleo quanto a ponte entre as integrinas e as fibras de tensão, estruturas contráteis formadas principalmente por microfilamentos e miosina II [32, 33, 35, 36, 41]. Esta organização, ao mesmo tempo complexa e versátil, faz destas adesões estruturas sensíveis a estímulos mecânicos capazes de responder a diversos sinais tais como densidade protéica da MEC [233, 234], sua topografia [235, 236], rigidez [63, 237, 238], e perturbações mecânicas [53, 239, 240].

Pelo menos três diferentes tipos destas adesões foram descritas como ocorrendo em células aderidas a substratos 2D em função de sua localização na célula, tamanho, e composição, principalmente de proteínas estruturais e sinalizadoras [34, 241]. São eles: complexos focais, adesões focais e adesões fibrilares. Há ainda um quarto tipo, apesar de ser ainda pouco definido, que ocorreria em substratos 3D, o qual será comentado em outro tópico.

Os complexos focais são pequenos (aproximadamente $0.25 \mu\text{m}^2$) em relação aos outros tipos de adesão e ocorrem na periferia das células migratórias, principalmente no lamelipódio de células cultivadas em substratos 2D [242, 243], onde são formados e dissociados continuamente (apresentam rápido *turn-over*) [37, 243]. A força tracional dos complexos focais que não se dissociam diminui ao longo do processo de migração porque o vetor de tensão torna-se cada vez mais perpendicular à direção do movimento. Neste momento, as adesões se encontram mais longes da periferia celular, ocorrendo mais especificamente na região entre o lamelipódio e o núcleo da célula em migração. Conjuntamente, a força exercida sobre a estrutura de adesão aumenta levando ao aumento do seu tamanho e a formação de fibras de actina associadas. Este processo de maturação do complexo focal leva a estrutura a ser chamada de adesão focal, a qual é estacionária em relação à célula, mas móvel em relação ao substrato [244]. As adesões focais apresentam maior força de ligação ao substrato, *turn-over* lento, e encontram-se associadas a fibras de tensão (enquanto os complexos focais não). Este modelo é sustentado por experimentos com substratos 2D elásticos, os quais mostraram que são os complexos focais nascentes que aplicam forças tracionais elevadas e seriam os

principais responsáveis pela translocação celular [242], enquanto as adesões focais teriam como função resistir às forças propulsoras de modo a manter a morfologia da célula e dar direcionamento ao movimento [245]. Em parte, a maturação de complexos focais em adesões focais é mediada pela contração induzida por RhoA [51, 246] e seu efetor Rho quinase [247, 248], que sinalizam para a formação e aumento das fibras de tensão associadas às adesões. Este processo pode ser mediado por uma série de fatores extracelulares, dentre eles soro, LPA e PDGF [249]. Já as adesões fibrilares formam-se a partir da interação de integrinas do tipo $\alpha_5\beta_1$ com fibrilas de fibronectina [241, 250]. Elas diferem das adesões focais em sua morfologia alongada, distribuição mais central, no tipo de integrina ($\alpha_5\beta_1$ na adesão fibrilar e principalmente $\alpha_v\beta_3$ em adesões focais) e na composição de proteínas associadas na porção citoplasmática.

Além das adesões célula-MEC, vários fatores foram descritos como reguladores, diretos ou indiretos, da migração de fibroblastos, tais como EGF [251], bFGF [252], PDGF [253, 254], TGF-beta [255, 256], entre outros [257, 258, 259, 260, 261]. Dentre os fatores indutores de migração, o PDGF é aquele mais bem estudado [262], principalmente porque experimentos *in vitro* demonstraram que a indução da migração de fibroblastos ocorre preferencialmente pelo estímulo por este fator de crescimento [253, 254]. O PDGF, além de induzir a migração de fibroblastos, age ainda como mitógeno e estimula a produção de proteínas de MEC, incluindo fibronectina [263], colágeno [264], ácido hialurônico [265] e colagenases [266]. A aplicação *in vivo* da isoforma BB de PDGF (PDGF-BB) em lesões da pele induz a formação do tecido de granulação [267, 268], diminuindo o tempo de cicatrização [269].

Curiosamente, algumas observações sugerem que o PDGF não induz a migração celular, mas apenas aumentaria sua atividade e a direcionaria atuando como agente quimiotático [253, 254, 270]. O fator iniciador da migração celular seria o substrato de MEC, particularmente de colágeno do tipo I, uma vez que fibroblastos iniciam a migração sobre este substrato sem que haja presença de soro ou fatores de crescimento [270]. Uma vez iniciada a migração sobre o substrato, PDGF-BB atuaria no aumento da atividade migratória assim como no direcionamento da translocação em direção a locais de maior concentração do fator de crescimento. O PDGF é reconhecido pelas células via dímeros de receptores de PDGF (PDGFR). A dimerização e ativação de PDGFRs, pela ligação com PDGF, ativam a sítio tirosina quinase do receptor que apresenta capacidade de auto-fosforilação seguida do recrutamento de uma série de moléculas sinalizadoras

tais como Rho, fosfolipase C γ , fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K), pp60^{src}, SHC e o complexo Grb2-Sos. Estas proteínas sinalizadoras associadas ao receptor medeiam, por sua vez, a ativação de cascatas de sinalização como Rho quinase, proteína quinase C (PKC), Akt, Rac e Ras, que em última instância irão desencadear os eventos que levam a respostas celulares, como a migração [262]. Todavia, é importante notar que os mecanismos que medeiam os efeitos da MEC e de fatores de crescimento sobre a migração celular parecem ser, em grande parte, interdependentes no sentido de que, (1) fatores de crescimento exercem efeitos diretos sobre a síntese de macromoléculas da MEC, receptores celulares e enzimas de degradação da MEC, enquanto (2) a natureza macromolecular do substrato exerce efeitos regulatórios sobre a resposta celular aos fatores de crescimento [254, 271, 272, 273].

Dentre as proteínas que se associam e/ou são ativadas por PDGFRs, aquelas da família Rho merecem maior destaque no processo de migração celular [274]. A família Rho de pequenas GTPases é composta por aproximadamente 20 genes distintos que codificam proteínas ligantes de GTP, dentre as quais RhoA, Rac e Cdc42 se destacam no fenômeno de migração celular ao cooperarem na regulação da polimerização de microfilamentos. RhoA ativa proteínas tais como mDia 1/2 e Rho quinase, que promovem a polimerização de fibras de tensão e a fosforilação das cadeias leves de miosinas II associadas [249]. Já Rac e Cdc42 estimulam a polimerização de actina que leva à formação de lamelipódios e filopódios, respectivamente. Além disso, tanto Cdc42 quanto Rac induzem a formação dos complexos focais [249, 275, 276]. Em fibroblastos Swiss 3T3 observou-se que estas GTPases são ativadas sequencialmente em uma cascata linear, onde a ativação de Cdc42 levava à ativação de Rac e, subseqüentemente, de Rho [249, 276]. Contudo, estudo posterior demonstrou que a sinalização por mutantes com Cdc42 e Rac constitutivamente ativos, assim como a ativação de Rac por incubação celular com PDGF, levam a diminuição da atividade de Rho [277]. Em contraste, a ativação de Rho não afetou a atividade de Rac, indicando que há uma sinalização unidirecional de Rac para Rho que leva a inibição da atividade do segundo. Curiosamente, o mutante com Rac constitutivamente ativa inibiu também a atividade migratória dos fibroblastos, e a restauração da atividade de Rho pela expressão de um mutante constitutivamente ativo resultou no resgate do fenótipo migratório, indicando que o balanço recíproco entre as atividades destas GTPases é fator determinante no fenótipo migratório.

A figura 8 resume simplificadamente o modelo mais comum de migração de fibroblastos sobre substratos 2D, que envolve três elementos interdependentes: adesão do lamelipódio ao substrato, contração no corpo celular e retração de membrana na porção posterior. Do ponto de vista morfológico, fibroblastos migrando em superfícies 2D apresentam uma morfologia achatada, com formato próximo a um semicírculo, decorrente dos processos de adesão e organização do citoesqueleto [278]. Na porção anterior da célula, integrinas em baixa densidade se associam à MEC formando adesões do tipo complexos focais que se associam a microfilamentos. Estas adesões são estacionárias em relação ao substrato e, portanto, mudam de posição no plano da membrana durante a translocação celular [244]. Concomitantemente, Cdc42 e Rac induzem a polimerização de actina resultando na formação de filopódios e lamelipódios [279]. Como os microfilamentos encontram-se ancorados aos complexos focais, a contínua adição de actina aos microfilamentos empurra as membranas de lamelipódios e filopódios promovendo a translocação da porção anterior da célula [280]. Enquanto a célula expande sua membrana à frente, os complexos focais aproximam-se do centro da célula e podem ter dois destinos: dissociarem-se ou maturar em adesões focais. As adesões focais formam-se pela atividade de RhoA [51, 246] e Rho quinase [247, 248], e são caracterizadas por apresentar alta densidade (*clustering*) de integrinas e associação com fibras de tensão. Estas adesões são responsáveis por realizar forças contráteis que auxiliam as forças de tração da célula migratória, provavelmente determinando a direção do movimento [245]. Na porção posterior da célula também encontram-se adesões focais, mas com composição de proteínas citoplasmáticas associadas um pouco distinta. A estas adesões são direcionados microtúbulos que ajudam a dissociar as integrinas da MEC permitindo a retração da porção posterior da membrana e a migração à frente pela célula [41, 281].

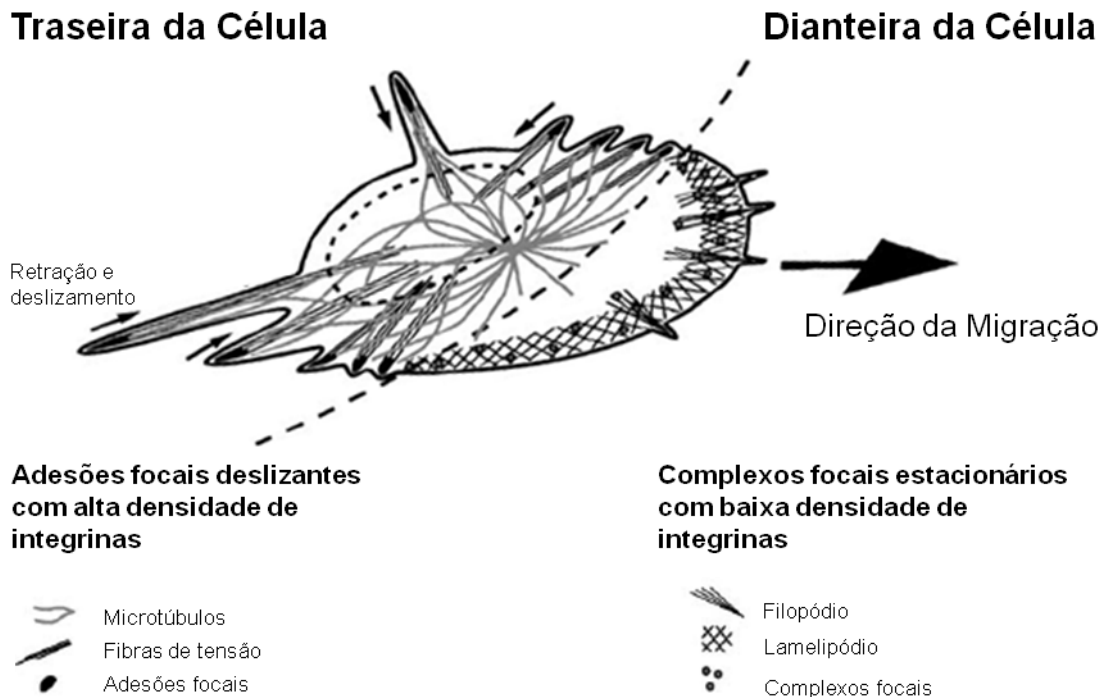


Figura 8. **Modelo de migração celular em substrato 2D.** Adaptado de Wehrle-Haller e Imhof, 2003.

1.5.2. Migração em matriz 3D de colágeno

As investigações da migração celular sobre substratos 2D ajudaram a definir a dinâmica das interações entre células e substrato mediadas por integrinas, transdução de sinais, organização do citoesqueleto e mobilidade celular. Contudo, o modelo de migração sobre substratos planos apresenta diversas deficiências como modelo de estudo do fenômeno *in vivo*, principalmente se considerarmos que no corpo humano as células migram quase que exclusivamente em ambientes de MEC 3D, um ambiente físico e bioquímico muito mais complexo. Há características do fenômeno de migração que são fundamentalmente diferentes entre os modelos 2D e 3D, sendo particularmente importantes na translocação de fibroblastos em ambientes 3D os mecanismos de: (1) dinâmicas de morfologia e adesão celular, (2) remodelamento local de matriz dependente de contato e (3) proteólise local da matriz por proteases expostas na membrana ou secretadas pelas células. Apenas os dois primeiros serão detalhados em vista da importância para os resultados do presente trabalho.

Do ponto de vista físico podemos citar uma série de diferenças importantes entre os modelos 2D e 3D de migração celular. Primeiro, as superfícies plásticas e vítreas

utilizadas em cultivos 2D não se deformam com a força exercida pelas células, fazendo com que a resistência do substrato, e conseqüentemente a força de tração celular, atinjam o valor máximo. Por outro lado, nos substratos flexíveis utilizados em cultivos 3D a força de tração da célula pode deformar o substrato e diminuir, ou mesmo inibir, translocação celular. Segundo, as forças exercidas pelas células sobre a matriz 3D alteram tanto localmente quanto globalmente a resistência da MEC, potencialmente influenciando o comportamento migratório de todas as outras células da matriz. Terceiro, enquanto células que migram sobre substratos 2D só podem tracionar no plano do substrato, em um ambiente 3D as adesões celulares podem ocorrer ao longo de todo o plano da membrana plasmática. Quarto, a porosidade da MEC 3D pode cercar o movimento da célula se as dimensões dos poros da rede forem menores que as dimensões da célula. Quinto, apesar da composição macromolecular da matriz 3D poder ser idêntica à de substratos recobertos, sua organização é completamente distinta, alterando o modo de interação com as células. Sexto, uma gama de outros fatores físicos menos estudados, mas não necessariamente de menor relevância dos que aqueles expostos acima, podem influenciar na migração celular, entre eles: dinâmica dos fluidos, difusão dos gases, resistência a rompimento dos componentes poliméricos da matriz, etc.

A importância dos fatores físicos do ambiente também pode ser apreciada no impacto que causa sobre a fisiologia da célula. Por exemplo, foi comentado acima que as dimensões das adesões focais e de suas fibras de tensão são proporcionais às forças aplicadas sobre o complexo. Decorre deste fato que células migrando sobre matrizes deformáveis (pouco resistentes às forças tracionais das células) não apresentam adesões focais, ou estas são subdesenvolvidas [95]. Outro exemplo pode ser observado em estudos com fibroblastos cultivados em géis de colágeno ou superfícies 2D recobertas com colágeno, ou seja, substratos que apresentam química idêntica mas ambiente físico distinto. Nestes experimentos, demonstrou-se, por exemplo, que os fibroblastos cultivados em géis eram capazes de apresentar maior expressão de receptores do tipo integrina $\alpha_2\beta_1$ [146]. Este fato torna-se extremamente relevante quando se observa que a migração de fibroblastos em matrizes 3D foi demonstrada como sendo dependente da expressão desta integrina na membrana plasmática [282] enquanto em substratos 2D outras integrinas têm maior relevância na migração celular [162, 244].

Os modelos de migração *in vitro* em matrizes 3D são poucos. Aqueles que têm apresentado melhores resultados são caracterizados por apresentarem uma matriz contendo células e uma segunda matriz polimerizada sem células a volta da primeira, para as quais as células migram. É o caso, por exemplo, de explantes de tecidos envoltos por matrizes de colágeno puro [207, 283, 284]. Um modelo semelhante que oferece maior controle das variáveis experimentais foi desenvolvido por Clark e colaboradores para estudos acerca da migração celular em tecidos lesados [285, 286]. Neste, se observa a migração celular a partir de matrizes de colágeno contraídas (equivalentes dermais contendo células) para géis de fibronectina/fibrina, sem células, que envolviam a primeira matriz. Contudo, a velocidade de migração nestas matrizes é lenta e os ensaios *in vitro* requerem dias, e até semanas, para serem avaliados [287, 288, 289]. Um terceiro modelo, que melhor se presta ao estudo da migração de fibroblastos nos tecidos conjuntivos foi desenvolvido por Grinnell e colaboradores [200]. Este modelo é bastante parecido com aquele desenvolvido por Clark e colaboradores, porém tanto a matriz com células quanto aquela sem células é formada apenas por colágeno do tipo I.

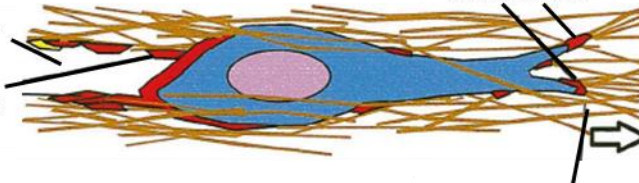
Assim como em sistemas 2D, a migração de fibroblastos por tecidos ou cultivos 3D ocorre via mecanismos de adesão e de-adesão acoplados a mudanças na morfologia celular e proteólise de componentes da MEC [34, 134, 241, 290]. Além disto, os elementos básicos da migração celular observada em substratos 2D são mantidos na migração de fibroblastos em matrizes de colágeno 3D (figura 9A): (1) polarização celular, (2) processo membranosos à frente da célula que realiza a força tracional, (3) contração do corpo celular, e (4) retração da porção posterior da célula [84, 278]. Por exemplo, a migração de células MV3 de melanoma em matrizes 3D de colágeno envolve uma projeção de membrana na porção frontal da célula, a qual chamaremos de pseudópodo, muito parecida com o observado em fibroblastos [291]. Este pseudópodo adere ao substrato onde ocorre o agregamento de subunidades β_1 de integrinas nos pontos de interação com o colágeno. A medida que a célula migra sobre a matriz as integrinas β_1 aproximam-se do corpo celular e passam a localizar-se lateralmente na célula [114], até que na porção posterior, onde ocorre a retração da célula, as integrinas são soltas na matriz de colágeno ou internalizadas [114, 292, 293]. De modo muito similar ao que ocorre na migração sobre superfícies 2D recobertas com colágeno ou fibronectina, a migração de fibroblastos em matrizes 3D de colágeno é inibida pela

adição de anticorpos anti- β_1 e anti- α_2 [292, 294], demonstrando a importância da adesão no processo migratório desta célula.

Células migrando individualmente

(A) Migração "fibroblastóide"

Deposição de porções da membrana e receptores de superfície

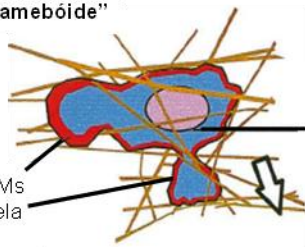


Clustering de receptores (integrinas,...)

Tração das fibras protéicas e remodelamento da MEC

(B) Migração "amebóide"

Integrinas/CAMs distribuídas pela membrana

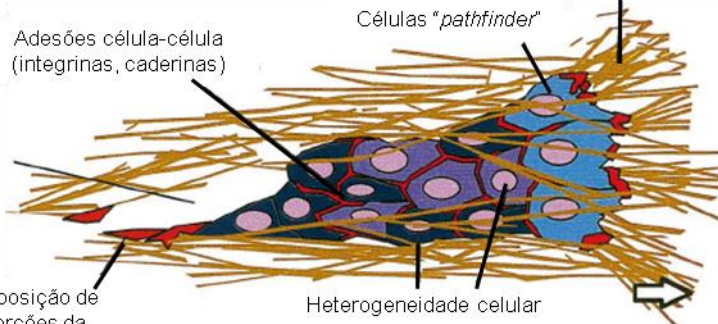


Morfologia amebóide. Não há remodelamento da MEC

Células migrando em clusters

Adesões célula-célula (integrinas, caderinas)

Deposição de porções da membrana e receptores de superfície



Tração das fibras protéicas e remodelamento da MEC

Células "pathfinder"

Heterogeneidade celular

Figura 9. **Modelos de migração em matrizes 3D.** Representações esquemáticas da morfologia celular, distribuição de receptores de superfície e interações com as fibras da MEC, como detectadas por microscopias de fluorescência e de reflexão [9,98]. A migração "amebóide" ocorre preferencialmente quando há tratamento com inibidores de proteases. Figura adaptada de Friedl e Bröcker, 2000.

Do ponto de vista morfológico, fibroblastos migrando em superfícies 2D apresentam uma morfologia achatada, com formato próximo a um semicírculo,

decorrente dos processos de adesão e organização do citoesqueleto [278]. Normalmente observa-se um largo e chato lamelipódio na sua porção anterior, ainda que por vezes possam ocorrer dois ou mais (figura 8). Os lamelipódios apresentam *ruffling* de membrana e pequenas e finas projeções em suas bordas, chamados filopódios, onde se iniciam as interações entre integrinas e MEC [19, 295, 296]. Atrás dos filopódios observa-se o corpo celular, onde se localizam as organelas da célula, inclusive o núcleo. Na porção posterior da célula observam-se prolongamentos de membrana plasmática que estão em processo de retração. Tanto a velocidade de migração quanto o aspecto morfológico, neste caso, são praticamente constantes.

Em tecidos *in vivo*, ou em géis de colágeno, os fibroblastos são também polarizados mas nunca apresentam esta morfologia achatada e em forma de semicírculo, uma vez que a organização física do ambiente é tridimensional. Da mesma forma, não há migração persistente e a morfologia da célula é modificada ao longo do processo [291]. Em MEC 3D, as células migratórias são predominantemente bi- ou tripolares [19, 278, 297]. Ao contrário dos lamelipódios observados em cultivos 2D, as porções anteriores de fibroblastos em matrizes 3D lembram finos pseudópodos cilíndricos, em cujas extremidades observa-se a atividade de *ruffling* de membrana, e nos “corpos” a presença de microprojeções de membrana [19, 295, 298].

Apesar dos pseudópodos cilíndricos em cultivos 3D serem análogos aos lamelipódios chatos observados em cultivos 2D [84], há diferenças importantes nas adesões e na estrutura do citoesqueleto de actina presentes nos dois modelos. Uma das primeiras demonstrações da formação de adesões fibroblasto-MEC em matrizes 3D foi realizada por Cukierman e colaboradores (2001) empregando matrizes derivadas das próprias células [62]. Os pesquisadores observaram que integrinas com a subunidade α_5 colocalizavam-se com paxilina nos cultivos 3D, mas não nos cultivos 2D. Nestes últimos, integrinas α_5 , mas não paxilina, colocalizavam-se com fibrilas de fibronectina do substrato (nas chamadas adesões fibrilares), enquanto paxilina, e não integrinas α_5 , colocalizavam-se com adesões focais. Esta simples diferença de composição protéica das adesões sugere que fibroblastos em matrizes 3D não formam adesões do mesmo tipo que aquelas observadas em substratos rígidos 2D. Outra diferença significativa observada era que as adesões dos fibroblastos cultivados em matrizes 3D perdiam a capacidade de auto-fosforilação de Fak em seu sítio de tirosina 397 [62]. Os autores denominaram estas adesões de “adesões de matriz 3D” (do inglês, “*3D matrix*

adhesions”) para separá-las tanto de adesões focais quanto de adesões fibrilares observadas em cultivos 2D. Diferenças entre adesões focais, adesões fibrilares e adesões de matriz 3D [241, 299] podem ser resumidamente apreciadas na tabela 5.

Tabela 5: **Diferenças moleculares entre adesões célula-matriz *in vitro*.**

	Complexos focais	Adesões focais	Adesões fibrilares	Adesões de matriz 3D
Substrato empregado	Ao menos uma proteína da MEC	Ao menos uma proteína da MEC	Fibronectina e alguma outra proteína da MEC	Fibronectina e outras proteínas da MEC
Integrina α_5	-	-	+	+
Integrina β_1	-	+	+	+
Integrina $\alpha_v\beta_3$	-	+	-	-
Paxilina	+	+	-	+
Tensina	-	+	+	+
Talina		+	+	+
Vinculina	+	+	-	+
Fosfo-tirosina	+	+	-	+
pp125Fak	+	+	-	+
pp125Fak – pY³⁹⁷	-	+	-	-

+ presente; - ausente

Apesar das adesões de matriz 3D de Cukierman e aquelas observadas em géis de colágeno serem mediadas por integrinas distintas, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$ respectivamente, a presença da subunidade β_1 em ambos os casos é sintomática [146, 147, 294, 297]. O agrupamento (*clustering*) de integrinas β_1 observado em adesões focais de fibroblastos [300] e nas adesões de matriz 3D também ocorre nos pontos de associação dos pseudópodos de células de melanoma com as fibras de colágeno em matrizes 3D confirmando que o conceito de *clustering* de receptores mediados por ligantes extracelulares também ocorre em modelos 3D [114, 292]. Após o bloqueio da interação integrina-ligante em matrizes 3D, a distribuição dos receptores torna-se constante ao longo de toda a membrana plasmática e as células perdem a morfologia polarizada, tornando-se arredondadas, apesar de apresentarem oscilações contínuas na organização

do citoesqueleto [292]. Este dado reforça a tese de que a adesão mediada por integrinas, e particularmente daquelas que apresentam a subunidade β_1 , é necessária para a interação celular com matrizes 3D durante a migração. *In vivo*, experimentos de inibição de integrinas por anticorpos, antagonistas peptídicos ou oligonucleotídeos *antisense* sugerem que as subunidades β_1 de integrinas também são importantes na migração de células da crista neural, mioblastos e neuroblastos [301].

Todavia, a adesão de matriz 3D descrita por Cukierman e colaboradores é apenas um caso específico de adesão à MEC preparada pelos autores. Claramente as adesões de fibroblastos são altamente adaptáveis ao ambiente em que a célula se encontra. Basta lembrar que o tamanho das adesões via integrinas e das fibras de tensão associadas é diretamente proporcional à força ou resistência aplicada sobre elas [53, 54, 55]. Este fato contribui para que, potencialmente, as fibras de tensão apresentem atividade anti-migratória ao invés de promover o translocamento. Em concordância com esta hipótese, a expressão de fibras de tensão é maior em células estáticas aderidas a substratos rígidos [302]. Em ambientes 3D, a formação de fibras de tensão pode ser observada em células estáticas tanto em processos de contração de lesões *in vivo* quanto em fibroblastos cultivados em matrizes 3D de colágeno fixadas ao substrato [126, 303]. Contudo, no tecido de granulação *in vivo*, assim como em géis flutuantes de colágeno, a migração de fibroblastos ocorre sem que se observe a formação de feixes de microfilamentos [126, 303]; a distribuição de actina é difusa por todo o corpo celular [278, 298]. Torna-se claro, portanto, que o modelo de adesão observado em células migratórias em matrizes 3D requer um refinamento ainda não observado na literatura, inclusive porque o modelo de adesão a matriz 3D de Cukierman e colaboradores representa um caso específico e não deve compreender o que ocorre durante a dinâmica de migração em matrizes 3D de colágeno do tipo I.

Seja qual for o modelo macromolecular de adesão, ou os modelos, a migração em matriz 3D apresenta características comuns àquelas observadas em superfícies 2D no que tange a sinalização intracelular. Por exemplo, foi comentado acima que a migração de fibroblastos em matrizes 3D é dependente da expressão de certas integrinas na membrana da célula, mas a inibição de moléculas citoplasmáticas como miosina II e Rho quinase são igualmente capazes de cessar a translocação de fibroblastos [200]. As pequenas GTPases reguladoras da dinâmica de microfilamentos Cdc42, Rac e Rho também apresentam papel preponderante no modelo 3D. Por exemplo, a expressão de

isoformas dominante negativas de Cdc42, Rac ou Rho inibe a invasão de géis de colágeno por fibroblastos estimulados por PDGF, enquanto apenas a ativação de Rac se mostrou necessária para a migração em substrato 2D [304]. Curiosamente, a invasão também foi inibida por formas constitutivamente ativas de Cdc42 ou Rho e, em menor grau, Rac. Em 1999, Moorman e colaboradores demonstraram que os efeitos sobre a dinâmica do citoesqueleto das células são dependentes, não do nível absoluto de expressão e atividade destas pequenas GTPases, mas de um balanço na atividade de todas elas [305]. É provável que o mesmo seja verdadeiro para células em cultivos 3D.

No que tange a sinalização extracelular, há diferenças marcantes entre a capacidade de indução da migração de fibroblastos em matrizes 3D. Os primeiros estudos de migração celular em matrizes 3D de colágeno foram realizados na presença de soro [19, 85, 289, 306]. Entretanto, estudos posteriores mostraram que o soro fetal bovino, assim como seus componentes LPA e fibronectina, não são capazes de induzir a migração de fibroblastos por matrizes de colágeno acima de um nível basal observado independentemente do tratamento [200]. Assim como nos cultivos sobre substratos 2D [253, 254], PDGF parece ser o principal agonista para a migração em géis de colágeno [200]. Este comportamento contraditório, uma vez que PDGF está presente em altas concentrações no soro, pode ser explicado em parte pela presença também de antagonistas da migração celular no soro, ou que exista algum componente do soro que seja capaz de inibir a sinalização disparada por PDGF. Por exemplo, o lipídio *sphingosine-1-phosphate* (S1P), presente no soro, pode ser um potente inibidor da migração de fibroblastos dependendo dos receptores expressos na membrana plasmática [186]. Além disso, foi descrito que a adesão a fibras de colágeno desnaturadas, normalmente utilizadas em recobrimentos de substratos 2D, é dependente de soro (ou dependente de fibronectina), enquanto a adesão a fibras nativas de colágeno pode ocorrer de modo independente do soro [307]. Como a migração de fibroblastos em géis de colágeno ocorre independentemente da adição de fibronectina na cultura [200] é possível que a falta de migração na presença de soro seja função de alta força de adesão celular, a qual restringiria a migração.

Há também um modelo de migração em matrizes 3D independente de adesão via integrinas β_1 . Este é um tópico controverso que foi descrito em alguns tipos celulares, ainda que nunca em fibroblastos. A migração de leucócitos pode ser reduzida por anticorpos anti- β_1 tanto *in vitro* [294, 308, 309, 310] quanto *in vivo* [311], apesar de

nunca ser completamente inibida. Em géis de colágeno, linfócitos T, monócitos e células dendríticas também continuam a migrar após bloqueio das subunidades β_1 das integrinas [297, 312]. Em células T cultivadas em matrizes de colágeno também não há compensações migratórias via CD44 ou integrinas com subunidades β_2 , β_3 ou α_v após o bloqueio das subunidades β_1 [95]. Experimentos *in vivo* no mesentério de ratos demonstraram que neutrófilos tratados com anticorpos anti- β_1 continuam migrando; apenas a velocidade é diminuída [311].

Estes dados sugerem que em alguns tecidos, principalmente aqueles que são compostos por MEC de baixa densidade, a migração pode ocorrer independentemente de adesão via integrinas β_1 . Demonstram ainda que há significativa migração *in vivo* ocorrendo independentemente destas integrinas, de um modo que os modelos de migração em substratos 2D não poderiam prever. Um mecanismo plausível que explica o comportamento migratório sem o emprego de adesões via integrinas β_1 é aquele no qual as células modificam o receptor de MEC utilizado para tracionar o substrato. Um segundo é aquele no qual uma gama de interações inespecíficas de baixa afinidade com o ambiente tecidual, por exemplo por resíduos de glicoproteínas carregados eletricamente, poderiam gerar conjuntamente a força tracional necessária à migração. Porém alguns dados sugerem que mecanismos físicos, como simples mudanças na forma da célula, poderiam ser responsáveis por estes movimentos.

Quando migram, as células se adaptam morfológicamente ao ambiente 3D, provavelmente utilizando os caminhos de menor resistência ao corpo celular, e podem utilizar a sua morfologia para imprimir a força necessária ao seu movimento. Por exemplo, videomicroscopias de neutrófilos migrando em matrizes 3D de membrana alantóide ou policarbonato mostram que estas células utilizam pseudópodos laterais para empurrar a matriz e gerar a tração necessária a translocação [313]. Aparentemente a membrana das células deformam sobre as fibras da matriz formando “anéis” de constrição que ancorariam e dariam suporte para a propulsão da célula [312, 313]. Outro exemplo advém de células T e células dendríticas cultivadas em géis de colágeno onde observa-se que a migração celular ocorre ao longo de fibrilas de colágeno preexistentes enquanto áreas em que a matriz é densa são circundadas ao invés de penetradas [95, 314].

Por fim, observações com inibidores de proteases em modelos de cicatrização de lesões *in vitro* também reforçam a tese da migração mediada por mudanças na

morfologia celular. Em géis de fibrina pouco densos, fibroblastos continuam migrando na presença de inibidores de metaloproteinases de matriz (MMPs) [315] ou serino-proteases [316], indicando que há mecanismos de migração independentes de proteólise da matriz protéica. A migração independente de protease pode resultar em uma mudança na morfologia da célula, de alongada para amebóide (figura 9B), associada à perda dos agrupamentos de integrinas nos locais onde a tração celular é exercida [116, 117].

Portanto, se os poros da MEC de um tecido forem elásticos ou de dimensão suficiente em relação ao tamanho e flexibilidade de uma célula, um processo mecânico determinado pela dinâmica morfológica pode ser uma estratégia suficiente para superar barreiras e mediar a migração [95, 313, 315]. Uma mudança similar ocorre pela ativação de ROCK, gerando um aumento na contração celular, rigidez dos complexos de actina e miosina II, arredondamento celular, e migração em matriz 3D [317].

1.1.1. Migração de fibroblastos transformados em matrizes 3D

Para que tumores se espalhem e realizem metástase, normalmente através de vasos linfáticos e sanguíneos, a migração celular através de tecidos conjuntivos é um pré-requisito. Entretanto, não há descrição de um mecanismo específico de migração em células transformadas; assim como ocorre com as células normais, as células tumorais translocam-se por tecidos ou matrizes 3D com a ajuda de mecanismos adesivos e proteolíticos [318, 319]. Baseados em observações histológicas e estudos *in vitro*, pelo menos dois mecanismos de invasão tumoral foram descritos [76, 318]: a migração de células individuais e a invasão e migração de agregados celulares ou *clusters* (figura 9). Apenas o primeiro será comentado devido a sua importância para o presente trabalho.

A ocorrência de metástases por meio de células individualizadas corresponde ao deslocamento entre tecidos de células transformadas que modificaram, perderam, ou nunca tiveram, adesões do tipo célula-célula e célula-MEC [320, 321]. Mutações ou menor expressão de receptores que medeiam interações célula-célula, como caderinas e cateninas, favorece mudanças na sinalização, morfologia celular e comunicação célula-célula, causando o descolamento das células do tumor primário [320, 322]. Após o descolamento, as células individualizadas invadem os tecidos adjacentes mantendo

principalmente interações do tipo célula-MEC ao invés de célula-célula. Em decorrência deste fenômeno, linhagens celulares tumorais continuam migrando mesmo quando se deparam com outras células transformadas ou células estromais residentes do tecido invadido. Em células normais, por outro lado, ocorre a chamada inibição do movimento por contato [323], e a perda deste mecanismo caracteriza o paradigma de migração de células tumorais representado normalmente em estudos de invasão tumoral.

Fibroblastos apresentam, por natureza, poucas adesões do tipo célula-célula, e as células de outros tecidos são ditas fibroblastóides quando apresentam características invasivas e migratórias em tecidos conjuntivos. Com efeito, células de diversas origens, ao se tornarem tumorigênicas e metastáticas passam por uma transformação fenotípica denominada de “transição epitelial para mesenquimal” (do inglês, *epithelial to mesenchymal transition* ou EMT) na qual as células adquirem um fenótipo fibroblastóide [324]. Além disso, as células dos tecidos conjuntivos, como os fibroblastos, também podem gerar tumores chamados fibrosarcomas.

Há diversas evidências de que células transformadas migram em tecidos da mesma forma que fibroblastos normais deslocam-se em substratos 3D. Primeiramente, células transformadas cultivadas em matrizes 3D apresentam polaridade na morfologia migratória, estendendo uma ou mais projeções citoplasmáticas na direção do movimento. Em segundo lugar, observa-se o agrupamento (*clustering*) de integrinas no plano da membrana plasmática, que por sua vez se associam às fibras da MEC [116, 292, 297, 299]. Em terceiro, após a interação entre integrinas e fibras da MEC o citoesqueleto de acto-miosina exerce forças tracionais sobre o substrato, evidenciadas pelo remodelamento local da MEC à volta das células [114, 325, 326]. E finalmente, células transformadas também secretam e/ou expõem enzimas proteolíticas na região pericelular [116, 117, 327, 328].

Um dado relevante, contudo, se refere às observações de que, assim como em substratos 2D [329, 330, 331, 332, 333], células transformadas costumam apresentar taxas de migração mais elevadas do que células normais também em matrizes 3D. Resultados deste gênero foram observados com linhagens tumorais [289], células transformadas por vírus SV40 [334], com alelo oncogênico de *h-ras* [333] ou mesmo pela inativação somente de p53 [335]. De todo modo, diferentes tipos de células transformadas também podem apresentar velocidades de migração extremamente distintas. Por exemplo, células derivadas de fibrosarcomas e de melanoma migram em

géis de colágeno de forma individualizada e lenta, com velocidades médias que variam de 11 a 36 $\mu\text{m}/\text{hora}$ [114, 116, 336], enquanto certos tipos de carcinoma migram *in vivo* a velocidades médias de até $180 \pm 132 \mu\text{m}/\text{hora}$ [337]. Esta disparidade pode estar relacionada a diferentes modos de migração celular [134]. No entanto, o tratamento com inibidores de protease em células de fibrosarcoma cultivadas em géis de colágeno, ou injetadas na derme de camundongos, permite que estas células continuem a migrar em velocidades muito parecidas às daquelas de células não tratadas [116, 117]. Ou seja, diferentes linhas de transformação induzem fenótipos migratórios distintos e é possível que as diferenças nas velocidades de migração em nada tenham a ver com a habilidade proteolítica das células.

2. Racional e premissas de trabalho

O papel do fenômeno de remodelamento de MEC ainda é pouco compreendido, em particular seus mecanismos de regulação. Trabalhos na década de 1980 demonstraram que fibroblastos murinos e humanos transformados pelo vírus SV40, assim como linhagens de sarcoma de ratos, apresentam reduzida habilidade de remodelar matrizes 3D de colágeno quando comparados a fibroblastos normais. Estes dados sugerem que em algum momento do processo de transformação celular as células têm desregulados um ou mais de seus mecanismos de remodelamento de MEC. A transformação celular que ocorre *in vivo* e inicia o processo de tumorigênese é um fenômeno complexo que, todavia, tem sido reproduzido *in vitro* através da perturbação de elementos genéticos definidos [338, 339, 340, 341]. Entre estes elementos, destacam-se a manutenção da estrutura telomérica, pela introdução de genes ativos de hTERT, desregulação das vias de p53 e pRB, por oncogenes virais, e a ativação de uma série de vias mitogênicas e promotoras de migração, como pela inserção alelos oncogênicos das proteínas *ras*. Portanto, será que alguma destas moléculas indutoras da transformação *in vitro* regula a habilidade de remodelamento de MEC de fibroblastos humanos?

Em 1981, Harris e colaboradores propuseram que o processo de contração dos tecidos ocorreria em decorrência da atividade migratória das células na matriz protéica. Em seguida, várias descrições na literatura também demonstraram uma correlação direta entre os fenômenos de migração e remodelamento de matriz. Por exemplo, ambos os fenômenos podem ser dependentes de sinalização por Rho, Rho quinase, mDia 1, miosina II, e as dinâmicas de microfilamentos e microtúbulos. Algumas evidências, entretanto, sugerem que a relação entre os dois fenômenos poderia ser mais complexa. Em primeiro lugar, há evidências de que células transformadas perdem a habilidade de remodelar MEC, enquanto outro conjunto de estudos demonstra que a transformação induz o aumento na habilidade migratória das células. Além disso, condições que não exercem efeitos intensos sobre a migração de fibroblastos em matrizes 3D de colágeno, como a adição de LPA ou SFB ao meio de cultivo, induzem altas taxas de remodelamento. Em terceiro, a migração de fibroblastos em matrizes 3D é inibida por blebistatina, um inibidor da atividade de miosina II, mas não exerce nenhum efeito sobre a contração observada no modelo FMC quando as células são estimuladas por LPA. Estas observações sugerem que a relação entre capacidade de remodelamento de

MEC e migração celular é mais complexa do que inicialmente imaginada, se é que há algum tipo de relação capaz de ser prognosticada.

3. Objetivo e hipóteses de trabalho

O objetivo mais geral deste trabalho foi estudar aspectos da migração e remodelamento de matriz extracelular por fibroblastos humanos pré-senescentes, normais ou transformados, cultivados em géis de colágeno do tipo I.

Considerando o racional, as premissas de trabalho e o objetivo traçado, as seguintes hipóteses foram testadas:

- 1) A habilidade de contrair matrizes 3D compostas de colágeno do tipo I por fibroblastos humanos pré-senescentes, pode ser reduzida
 - a) por inibição das proteínas pRB e p53, via inserção de oncogenes virais SV40-LT ou E6/E7;
 - b) e pela hiperativação de H-Ras, via expressão de um alelo oncogênico, o H-Ras^{V12}.

- 2) A habilidade de migrar em matrizes 3D compostas de colágeno do tipo I por fibroblastos humanos pré-senescentes, pode ser aumentada:
 - a) pela hiperativação de H-Ras, via expressão de um alelo oncogênico, o H-Ras^{V12}.

- 3) Não há, necessariamente, uma relação direta entre a habilidade de fibroblastos humanos remodelarem matrizes de colágeno do tipo I e a atividade migratória destas células nessa matriz.

4. Materiais e métodos

4.1. Materiais e suas procedências

Solução de colágeno Vitrogen-100 foi adquirida de Cohesion Technologies, Palo Alto, EUA. Soro fetal bovino *benchmark* foi obtido de Gemini, West Sacramento, EUA. PDGF (isotipo BB) foi obtido de Upstate Biotechnology, Lake Placid, EUA. Polibreno, BSA (livre de ácidos graxos) e LPA foram adquiridos de Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA. Meio de cultivo CO₂-independente, tripsina/EDTA e Opti-MEM foram adquiridos de GIBCO, Grand Island, EUA. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), faloidina-alexa 488, faloidina-alexa 594, anticorpo monoclonal *anti-mouse-alexa 488*, anticorpo monoclonal *anti-rat-alexa 488*, e o sistema de RT-PCR *Platinum Pfx DNA Polymerase* foram obtidos de Invitrogen, Gaithersburg, EUA. Anticorpos monoclonais anti-p53, anti-H-Ras (259), anti-SV40, anti-actina e anti-beta-tubulina foram obtidos de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA. Anticorpo monoclonal *anti-mouse* conjugado a HRP e anticorpo monoclonal anti-rato conjugado a HRP foram adquiridos de MP Biomedicals, Solon, EUA. Iodeto de propídeo foi obtido de Molecular Probes, Eugene, EUA. Fluoromount G foi obtido de Southern Biotechnology Associates, Birmingham, EUA. Reagente quimioluminescente *Western Lightning* foi obtido de PerkinElmer Life & Analytical Sciences, Waltham, EUA. FuGENE6 e RNase DNase-free foram adquiridos de Roche, Basel, Suíça. O plasmídeo pBABE-puro SV40-LT (13970) foi obtido de Addgene, Cambridge, EUA. Os plasmídeos pLXSN e pLXSN-E6/E7, assim como os *primers* de cDNA para HPV-16 E6 e E7 foram generosamente doados pelo Dr. Jerry Shay (*University of Texas Southwestern Medical Center*, Dallas, TX). Os plasmídeos pCLAmpho, pBabe-GFP e pBabe-hygro-H-Ras^{V12} foram generosamente doados pelo Dr. Michael White (*University of Texas Southwestern Medical Center*, Dallas, TX).

4.2. Células

4.2.1. Linhagens celulares e origens

Amostras de diferentes linhagens foram doadas por professores da *University of Texas Southwestern Medical Center* (Dallas, TX, EUA). Células embrionárias de rim humano da linhagem celular 293T foram generosamente doadas pelo Dr. Michael White. A linhagem de células Phoenix ecotrófica foi generosamente doada pelo Dr. Jerry Shay. Fibroblastos humanos transformados com o vírus SV40 da linhagem celular SV589 foram generosamente doados pelo Dr. Richard Anderson. Fibroblastos humanos da linhagem BR-5 foram isolados de prepúcios de doadores humanos e transfectados com hTERT no laboratório do professor Frederick Grinnell.

4.2.2. Transfecções com SV40-LT, HPV E6/E7 e H-Ras^{V12}

Células BR-5 foram transfectadas estavelmente com o plasmídeo pBabe-puro SV40-LT, que codifica o antígeno *large-T* do vírus SV40, utilizando um vetor retroviral anfotrópico. Para tal, 6×10^6 células 293T foram transfectadas transientemente com 3 μg pBabe-puro SV40-LT e 3 μg pCLAmpho, que codifica as proteínas empacotadoras do vetor retroviral, em solução contendo 300 μL de Opti-MEM e 18 μL de FuGene 6 em 8mL de DMEM suplementado com 10% SFB. Paralelamente 6×10^6 células 293T foram transfectadas com 3 μg pBabe-GFP e 3 μg pCLAmpho, para se determinar a eficiência da transfecção por microscopia de fluorescência. Após 24 horas de incubação a 37°C o meio de cultivo foi substituído por 2 mL de DMEM suplementado com 10% SFB. Após novas 24 horas de incubação, a eficiência da transfecção foi avaliada por microscopia de fluorescência para células transfectadas com GFP. A eficiência do protocolo é de 50-90%. O meio de cultura contendo as partículas retrovirais (vírions) das células transfectadas com pBabe-puro SV40-LT foi coletado com seringa e filtrada em membrana de 0,45 μm . O filtrado foi adicionado a 2,5 mL de DMEM suplementado com 10% SFB e polibreno na concentração final de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A solução foi adicionada a placa contendo 10^5 células BR-5. Após incubação *overnight*, a 37°C, o meio de cultivo

foi substituído por DMEM suplementado com 10% SFB e puromicina 2 µg/mL, onde a linhagem foi cultivada por 10 dias.

A expressão das proteínas E6 e E7 do vírus do papiloma humano (HPV) foi realizado como descrito com pequenas modificações [342]. Brevemente, o plasmídeo contendo os genes para HPV E6 e E7 foram transfectados em células Phoenix ecotróficas pelo método de precipitação com fosfato de cálcio. O sobrenadante contendo os vírions foi coletado com seringa e filtrado em membrana de 0,45 µm. O filtrado foi adicionado a 6 mL de DMEM suplementado com 10% SFB e 8 µg/mL polibreno, e incubado em placa contendo 10⁵ células BR-5. Após 48 horas de incubação a 37°C, o meio de cultivo foi substituído por DMEM suplementado com 10% SFB e 1 mg/ml G418, onde a linhagem foi cultivada por 7 dias.

Foram desenvolvidas linhagens BR-5 expressando H-Ras^{V12}, o alelo oncogênico da proteína H-Ras, mas estas células entraram em senescência (dados não mostrados). Para superar esta dificuldade, o gene para H-Ras^{V12} foi expresso em células BR-5 que expressavam as proteínas E6 e E7 de HPV. O protocolo foi o mesmo utilizado para transfectar as células com SV40-LT, sendo que se utilizou a linhagem BR-5 E6/E7 (e não a BR-5) e a seleção ocorreu com 50 µg/mL de higromicina.

4.2.3. Manutenção de culturas

Células das linhagens 293T, SV589, BR-5, BR-5 SV40-LT, BR-5 E6/E7 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} foram cultivadas imersas em meio de cultivo DMEM suplementado com 3,7 g/L bicarbonato de sódio e 20mM HEPES (DMEM) e 10% SFB em garrafas de poliestireno tratado para cultivo, com 75 cm² de área cultivável. As garrafas foram mantidas em incubadora úmida a temperatura constante de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

4.2.4. Condições experimentais de cultivo

Experimentos que incluíam incubação de células BR-5 sobre substratos adsorvidos com colágeno ocorreram em incubadora úmida a temperatura constante de

37°C com atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultivo foi DMEM suplementado com 5 mg/mL BSA (livre de ácidos graxos), 50 ng/mL PDGF, 10 µM LPA e/ou 10% SFB, segundo descrito na legenda das figuras. Os substratos utilizados foram lamínulas de vidro incubadas a 37°C por 1 hora com 50 µg de colágeno bovino tipo I diluído em 1 mL de DMEM. Logo após a incubação com solução de colágeno, as lamínulas foram lavadas por duas vezes com DMEM para retirar o colágeno não adsorvido.

As condições experimentais de cultivo de células em ambientes 3D estão descritas em detalhes em tópicos subseqüentes da seção “Materiais e Métodos”.

4.3. RT-PCR

Análise por RT-PCR foi empregada para verificação da expressão do RNA mensageiro de E6 e E7. O *design* dos *primers* foi realizado para amplificar especificamente E6 ou E7. Fita molde para E6 (nucleotídeos 201-220): 5'-GCAAGCAACAGTTACTGCGA-3', Fita reversa para E6 (nucleotídeos 503-522): 5'-CAACAAGACATACATCGACC-3'; Fita molde para E7 (nucleotídeos 652-671): 5'-AGCTCAGAGGAGGAGGATGA-3', Fita reversa para E7 (nucleotídeos 835-854): 5'-GGTTTCTGAGAACAGATGGG-3'. O PCR foi realizado pelo sistema *Platinum Pfx DNA Polymerase*, através de método indicado pelo fabricante, em um equipamento GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystem, Foster City, EUA). *Primers* para o RNA mensageiro de GAPDH foram utilizados como controle positivo da reação de RT-PCR. Para se assegurar que o ensaio permaneceu na faixa linear, o número de ciclos e a quantidade de RNA utilizada em 3 experimentos distintos foram variados.

4.4. Eletroforese, transferência eletroforética e *immunoblotting*

Para realizar experimentos de SDS-PAGE seguidos de *immunoblotting*, proteínas celulares foram extraídas a 4°C em tampão adequado (150 mM NaCl, 6 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, 2 mM EDTA, 1% *sodium deoxycholate*, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina A, 1 mM AEBSF, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, e 1 mM molibdato de amônio tetra hidratado, pH 7,0). Os extratos foram

clarificados por centrifugação a 11.000 g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes dissolvidos em tampão de amostra concentrado 4X (250 mM Tris, 8% SDS, 40% glicerol, 20% beta-mercaptoetanol, 0,04% azul de bromofenol) e fervido por 5 minutos. A concentração de proteínas nas soluções foi determinada pela mistura com reagente de Bradford e ensaio de absorvância em espectrofotômetro na faixa de 595 nm. Os géis de SDS-PAGE foram preparados para uma concentração final de 12% de acrilamida. As proteínas contidas nos géis de SDS-PAGE foram transferidas para membranas de PVDF sob corrente de 100V por 1 hora. As membranas foram incubadas em solução bloqueadora (leite em pó 5% dissolvido em T-TBS: 0,1% Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5) por 2 horas a temperatura ambiente, seguida de incubação por 12 horas a 4 °C em solução bloqueadora contendo anticorpos primários conforme descrito na legenda das figuras. Após lavagem em T-TBS, as membranas foram incubadas na presença de anticorpos secundários conjugados a HRP. Após nova lavagem em tampão T-TBS, os sinais nas membranas foram revelados pelo sistema *Western Lightning*, de acordo com indicações do fabricante.

4.5. Ensaio de imunofluorescência por microscopia óptica

Para imunomarcações com anticorpos fluorescentes, amostras de cultivos de células sobre lamínulas de vidro ou matrizes de colágeno foram fixadas por 10 minutos em temperatura ambiente imersos em tampão PBS (mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, e 6 mM Na₂HPO₄, pH 7,2) contendo formaldeído 3,7%. As amostras fixadas foram lavadas em tampão PBS, bloqueadas por 30 minutos em tampão PBS contendo BSA 2% e glicina 1%, e permeabilizadas por 15 minutos em tampão PBS contendo Triton X-100 0,5%. As amostras permeabilizadas foram incubadas por 1 hora a 37°C em tampão PBS contendo BSA 1% e corantes ou anticorpos conforme descrito na legenda das figuras, seguido de lavagem em tampão PBS. Se necessário, foi realizada nova incubação por 1 hora a 37°C em tampão PBS contendo BSA 1% e anticorpo secundário conforme descrito na legenda das figuras. As amostras imunomarcadas foram montadas entre lâminas e lamínulas de vidro na presença de 5 µL de Fluoromount G. As imagens das amostras imunomarcadas foram coletadas por *software* de aquisição MetaVue 6.2r6 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA) com auxílio de uma

câmera COOL Snap ES (Photometrics, Tucson, EUA) acoplada a microscópio Nikon Eclipse E600 utilizando objetivas Nikon PlanApo 10x/0.45, 20x/0.75, e 40x/0.75.

4.6. Curvas de crescimento

Amostras de linhagens celulares foram incubadas em placas de poliestireno de 6 poços na concentração de 2×10^4 células por poço e incubadas em DMEM contendo SFB 10% por 28, 55, 70, 85, 110 ou 140 horas, em estufa úmida a temperatura constante de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Para determinar o número de células em cada ponto de coleta, as amostras relativas a determinado ponto foram “tripsinizadas” e o número de células soltas foi estimado por contagem em câmara de Neubauer.

4.7. Crescimento em *soft-agar*

O experimento de crescimento celular em *soft-agar* foi realizado como descrito anteriormente com pequenas modificações [343]. Amostras contendo 2×10^4 fibroblastos foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% SFB e 0,35% (p/v) de ágar nobre sobre uma camada de DMEM suplementado com 0,5% de ágar nobre, em uma placa de poliestireno com 6 poços. Sobre cada poço de cultura, adicionou-se semanalmente 1 mL de DMEM suplementado com 10% SFB para evitar ressecamento das amostras. Após duas semanas de cultivo em estufa úmida a temperatura constante de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 % e visualizadas por microscopia de contraste de fase em microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M. A estimativa do crescimento celular ancoragem-independente foi realizada pelo cálculo do número médio de colônias em 10 campos fotografados por poço.

4.8. Microscopia de contraste de fase

Para realização de microscopias de contraste de fase, imagens de amostras vivas de culturas de células foram adquiridas por *software* de aquisição Metamorph 7.1.1.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA) com auxílio de uma câmera Nikon DXM1200F acoplada a um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss, Thornwood, EUA) equipado com objetiva Zeiss Achroplan 10X/0.25 PH1.

4.9. Remodelamento de matriz de colágeno

4.9.1. Preparo da matriz 3D de colágeno com células

O método de preparo das culturas de matriz de colágeno 3D encontra-se descrito na literatura [185]. Brevemente, fibroblastos em solução DMEM suplementada com colágeno bovino tipo I na concentração de 1,5 mg/mL e neutralizada eram pré-aquecidos em banho-maria a 37°C por 4 minutos, e alíquotas de 0,2 mL eram postas sobre marcações circulares de 12 mm de diâmetro feitas com compassos em placas de poliestireno de 24 poços (figura 10). As amostras eram então cuidadosamente transportadas para estufa seca com temperatura constante de 37°C para gelificação (polimerização) da matriz por 1 hora. À exceção de quando especificado o contrário, a densidade de células nas soluções era de 2×10^5 células por matriz em experimentos de remodelamento e 10^4 células por matriz em experimentos de microscopia óptica.

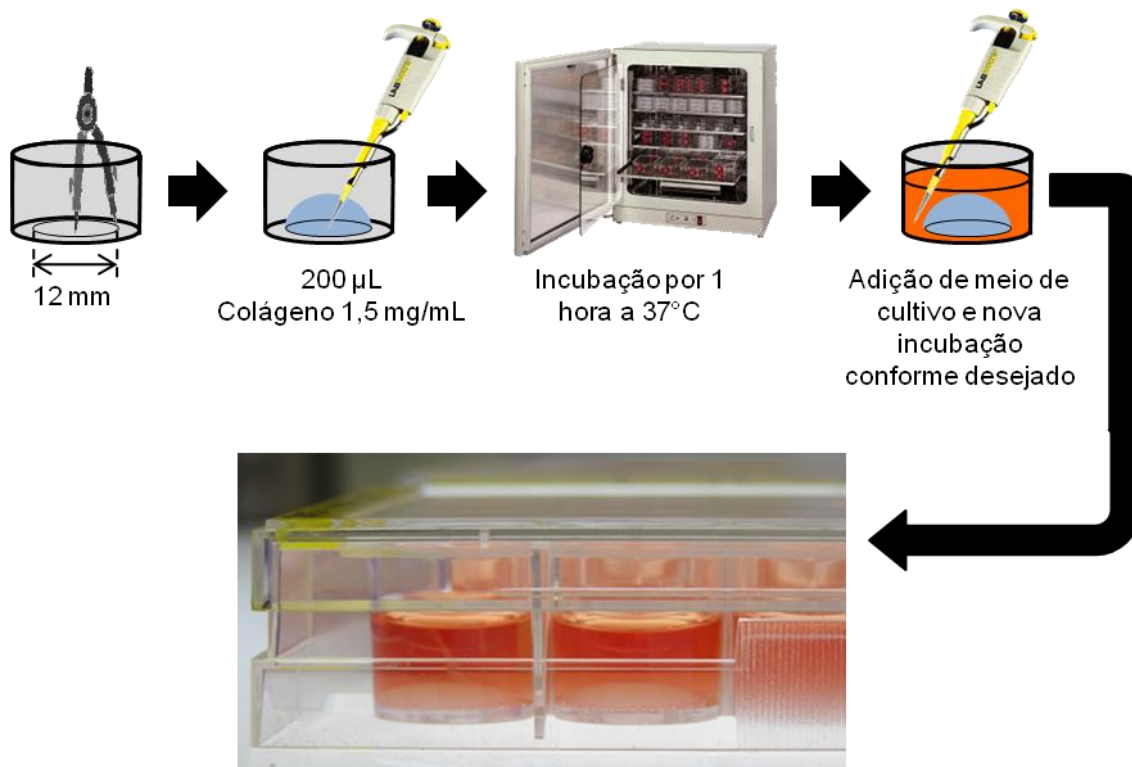


Figura 10. Preparo da matriz 3D de colágeno do tipo I contendo células.

4.9.2. *Floating matrix contraction (FMC)*

Para experimentos de *floating matrix contraction* (FMC), aos poços com matrizes polimerizadas se adicionaram 1 mL de DMEM suplementado como descrito na legenda das figuras após o qual as matrizes com células eram soltas do substrato plástico com o auxílio de espátula (figura 11). As matrizes flutuantes eram então incubadas pelos tempos descritos nas legendas das figuras em estufa úmida a temperatura constante de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, após o qual as amostras eram fixadas por 10 minutos em formaldeído 3,7% em tampão PBS.

4.9.3. *Stress-relaxed matrix contraction (SMC)*

Para experimentos de *stress-relaxed matrix contraction* (SMC), aos poços com matrizes polimerizadas se adicionaram 1 mL de DMEM suplementado com 10% SFB e as amostras foram incubadas por 24 horas em estufa úmida a temperatura constante de

37°C com atmosfera de 5% de CO₂. A seguir, as amostras foram lavadas três vezes com DMEM e foram então soltas do substrato plástico com o auxílio de espátula (figura 11). Às amostras flutuantes foram adicionados 1 mL de DMEM suplementado como descrito na legenda das figuras e as placas foram incubadas por 1 hora em estufa úmida a temperatura constante de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Subseqüentemente, as matrizes remodeladas eram fixadas por 10 minutos em formaldeído 3,7% em tampão PBS.

4.9.4. Avaliação quantitativa do remodelamento das matrizes

A extensão do remodelamento das matrizes de colágeno fixadas era determinada pela medida, em *software* MetaVue 6.2r6 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA), da área das amostras a partir de imagens escaneadas e utilizando a seguinte fórmula:

$$R = A_i - A_f$$

onde R corresponde à extensão de remodelamento, A_i à área inicial da matriz (antes do remodelamento) e A_f à área final (após o remodelamento). Como as marcas onde as matrizes eram polimerizadas apresentavam diâmetro igual 12 mm, A_i é sempre igual a 113 mm².

1.1.1. Estimativa da densidade de colágeno em matrizes remodeladas

A área das matrizes remodeladas foi estimada em *software* MetaVue 6.2r6 a partir de imagens digitalizadas dos géis fixados. A densidade foi estimada pela seguinte fórmula:

$$D_f = \frac{D_i \times A_i}{A_f}$$

onde D_f corresponde à densidade de colágeno na matriz remodelada, D_i é a densidade inicial de colágeno na matriz (igual a 1,5 mg/mL), A_i é a área inicial do gel (igual a 113 mm²) e A_f corresponde à área final da matriz remodelada. É preciso lembrar que esta é uma estimativa aproximada da densidade real, pois esta deve levar em consideração não

a área do gel, mas seu volume, assim como parâmetros adicionais tais como produção e degradação das fibras colágenas ao longo do tempo de cultivo.

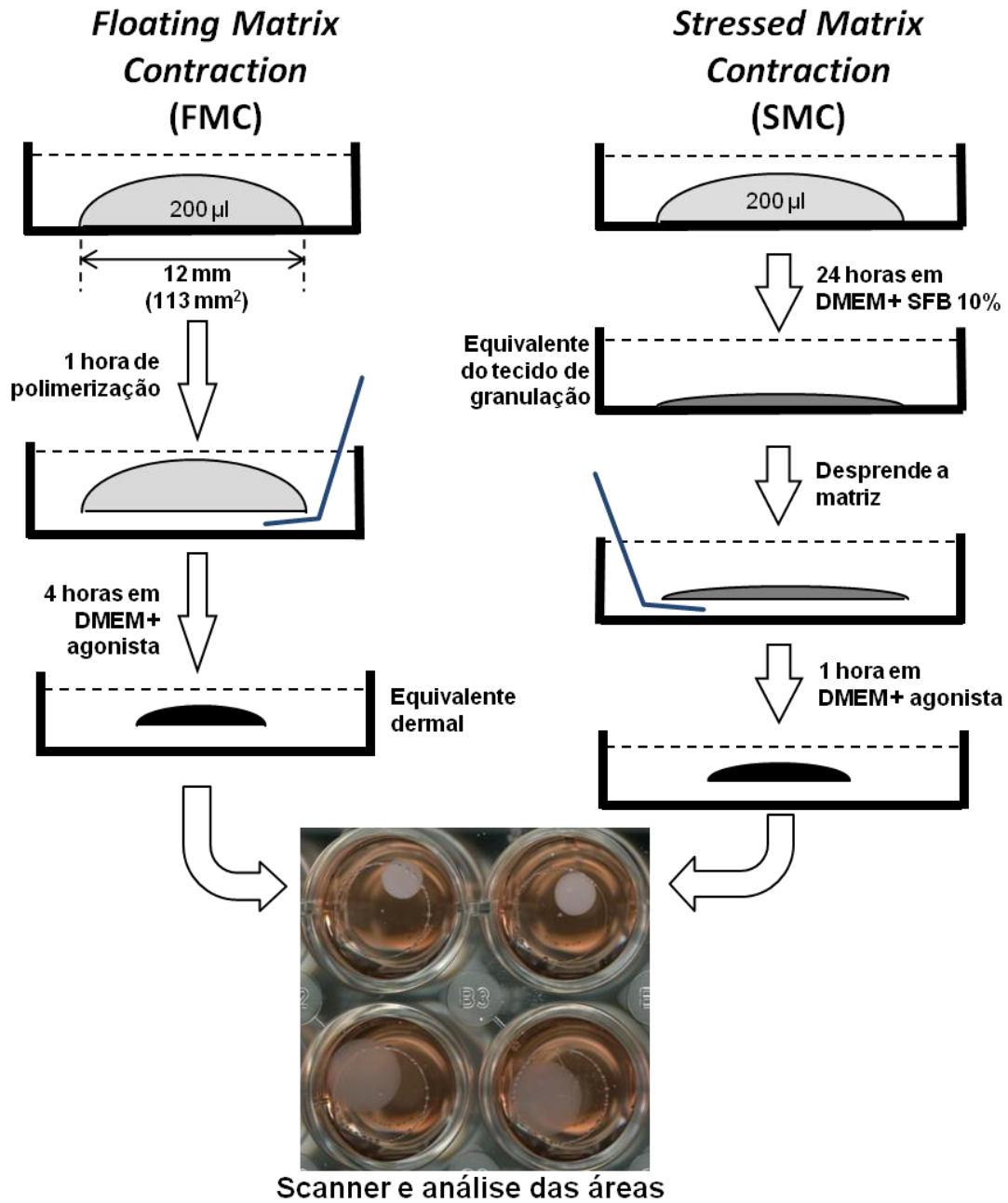


Figura 11. Modelos FMC e SMC de remodelamento de matriz de colágeno.

1.2. Migração celular

1.2.1. Ensaio de *scratch-wound*

As células foram coletadas e semeadas na concentração de 5×10^5 células/lamínula em lamínulas de vidro preparadas conforme descrito na seção 3.2.4. As placas contendo as amostras foram incubadas *overnight* a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as camadas de células foram lesionadas com o auxílio de um *tip* plástico de poliestireno (*scrape wounded*), lavadas com DMEM puro por duas vezes, e incubadas por 16 horas a 37°C em meio conforme descrito na legenda das figuras. Ao fim do período de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, incubadas com faloidina-alexa 488 1:150, iodeto de propídeo 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e RNase DNase-free 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e montadas entre lâmina e lamínula com o auxílio de Fluoromount G (5 μL). As imagens foram captadas por *software* de aquisição MetaVue 6.2r6 com auxílio de uma câmera COOL Snap ES acoplada a microscópio Nikon Eclipse E600.

1.2.2. Avaliação da velocidade de migração celular em colágeno adsorvido sobre lamínulas de vidro

As células foram coletadas e semeadas na concentração de 10^4 células/lamínula em lamínulas de vidro preparadas conforme descrito na seção 4.2.4. As placas contendo as lamínulas foram incubadas por 6 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as amostras foram lavadas em DMEM e incubadas por 5 horas a 37°C em meio CO_2 -independente contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF. Esta incubação ocorreu em câmara ambiental acoplada a um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M equipado com câmera digital Nikon DXM1200F. As amostras foram fotografadas em intervalos de 5 minutos e vídeos foram compilados a partir de fotos de cada ponto de tempo, utilizando o programa Metamorph 7.1.1.0. A velocidade de translocamento só foi mensurada em células individualizadas, que não sofreram mitose nem saíram do campo fotografado ao longo de todo o período de incubação. Ao todo, as velocidades de

60 células de cada linhagem foram mensuradas com o auxílio do *plugin* “*Manual Tracking*” do programa ImageJ 1.38X.

1.2.3. Migração celular em matriz 3D de colágeno aninhada

O método de preparo de matrizes aninhadas (*nested matrix*) para avaliação da migração celular em matriz 3D de colágeno encontra-se descrito na literatura [200]. Brevemente, matrizes remodeladas por 6 horas (ou como descrito na legenda das figuras) pelo método FMC foram aninhadas sobre gotas de 40 μL de solução de colágeno neutralizado na concentração de 1.5 mg/mL e, em seguida, recobertos com 160 μL da mesma solução (figura 12). O conjunto foi incubado em estufa seca a 37°C por 1 hora para que a matriz externa (sem células) pudesse polimerizar-se. As amostras foram então incubadas em DMEM suplementado como descrito na legenda das figuras em estufa úmida a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂ por 16 horas, para que houvesse migração da matriz aninhada para a matriz externa. Ao final do período de migração, as amostras foram fixadas por 10 minutos em tampão PBS contendo formaldeído 3.7%, lavadas por três vezes em tampão PBS e coradas e fotografadas como descrito na seção “Microscopia de Imunofluorescência”, exceto que, ao invés de anticorpos primários e secundários, foi empregado tampão PBS contendo 8 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídeo, 20 $\mu\text{g/mL}$ de RNase livre de DNase e faloidina-alexa-488 diluída na proporção de 1:150. As amostras foram montadas entre lâmina e lamínula com o auxílio de Fluoromount G (5 μL).

As imagens foram captadas por *software* de aquisição MetaVue 6.2r6 com auxílio de uma câmera COOL Snap ES acoplada a microscópio Nikon Eclipse E600. O número de células migratórias foi estimado pela contagem do número de núcleos corados com iodeto de propídeo fora da matriz aninhada (células que migraram da matriz aninhada para a matriz externa) em 15 campos microscópicos aleatórios para cada categoria amostral.

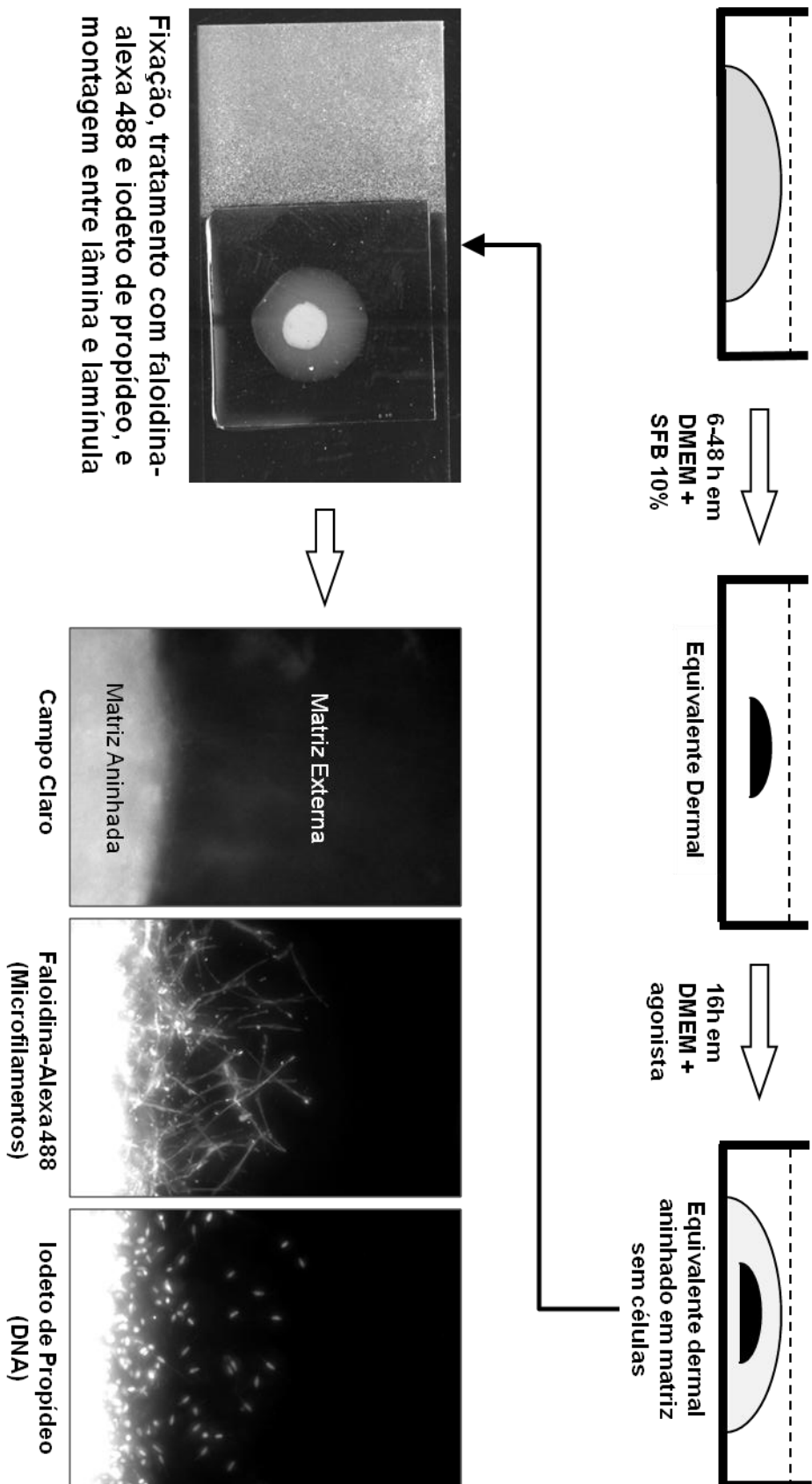


Figura 12. Modelo de migração celular em matriz de colágeno aninhada.

1.2.4. Microscopia de *time-lapse* da migração em matriz de colágeno aninhada

Matrizes aninhadas preparadas em placas de poliestireno de 24 poços foram colocadas em câmaras ambientais acopladas a um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M equipado com objetiva Zeiss Achroplan 10X/0.25 PH1 e uma câmera digital Nikon DXM1200F. A temperatura da câmara foi ajustada para permanecer constante a 37°C e em cada poço foi adicionado 1 mL de meio de cultivo CO₂-independente suplementado como descrito na legenda das figuras. As amostras foram fotografadas em intervalos de 10 minutos e em *Z stacks*, num total de 25 planos separados 15 µm entre si, utilizando o *software* de aquisição Metamorph 7.1.1.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). A cobertura de 375 µm nos *Z stacks* se fez necessária para assegurar que as células em migração fossem captadas em foco ao longo de todo o tempo de migração, uma vez que o conjunto matriz externa/matriz aninhada tipicamente contrai no plano Z ao longo do tempo. Assim, a cada tempo em que as amostras eram fotografadas, as células migratórias se localizavam em um plano de foco distinto. Os vídeos foram compilados a partir da foto relativa ao plano Z em que as células migratórias apareciam em maior foco a cada ponto de tempo, utilizando o programa Metamorph 7.1.1.0.

1.2.5. Avaliação da relação remodelamento/migração em matrizes de colágeno aninhadas

Para avaliar a relação entre remodelamento e migração celular, amostras foram preparadas, incubadas e fotografadas como em microscopias de *time-lapse*. Em cada vídeo foi mensurada a velocidade de translocamento de pelo menos 5 células individuais, isto é, células não associadas a outras células, que não sofreram mitose nem saíram do campo fotografado ao longo de todo o período de incubação. Também foram mensuradas a velocidade de translocamento de pelo menos 5 pontos fixos na malha de colágeno da matriz externa. As velocidades foram corrigidas em relação ao movimento da interface entre as matrizes aninhada e externa. As medidas de velocidade foram

realizadas com o auxílio do *plugin* “*Manual Tracking*” do programa ImageJ 1.38X. As médias e desvio padrão de cada ponto de tempo foram determinados a partir da velocidade de pelo menos 15 velocidades distintas de fibroblastos ou pontos da matriz externa.

2. Resultados

2.1. Linhagem de fibroblastos transformados com SV40 apresenta menor capacidade de remodelamento de géis de colágeno do que fibroblastos de uma linhagem pré-crise

Para confirmar os resultados de experimentos anteriores, os quais reportam que linhagens estabelecidas e/ou transformadas perdem a capacidade de remodelar géis de colágeno [80, 81, 86], comparou-se a habilidade de remodelamento das linhagens BR-5 (fibroblastos pré-crise transfectados com *hTERT*) e SV589 (fibroblastos pós-crise e transformados com vírus SV40) nos modelos FMC e SMC (figuras 13 e 14). Observa-se que, independentemente do modelo de remodelamento empregado, a capacidade basal (apenas na presença de BSA) da linhagem SV589 de contrair géis de colágeno do tipo I é aproximadamente 50% inferior àquela da linhagem BR-5, corroborando com os dados previamente publicados. Quando são empregados agonistas do fenómeno de remodelamento (LPA, PDF ou SFB), também se observa uma diminuição na indução da contração de géis de colágeno, porém o padrão de regulação é modificado. Além disso, a dinâmica do fenómeno de contração de matrizes flutuantes de colágeno mostra que mesmo após 24 horas de cultivo a contração realizada por células da linhagem SV589 não se aproximam daquelas efetuadas pelas células BR-5 (figura 14).

2.2. Controles das transfecções estáveis da linhagem BR-5 com *large-T* do SV40, HPV E6/E7 e H-Ras^{V12}

As perturbações mais importantes induzidas pelo vírus SV40 são a ligação e inativação das proteínas p53 e pRb pelo antígeno *large-T* do SV40, levando à desregulação do ciclo celular. Para estabelecer o papel desta proteína na capacidade de remodelamento de matrizes 3D de colágeno por fibroblastos, células BR-5 foram transfectadas com o gene que codifica o antígeno *large-T* do SV40. As figuras 15C e 16A confirmam a eficácia da transfecção em experimentos de *western blot* e microscopia de imunofluorescência.

Entretanto, outras proteínas do SV40, como o antígeno *small-T* do SV40, são capazes de perturbar a função de outras enzimas do hospedeiro [338, 339]. Verifica-se, portanto, que os circuitos regulatórios da célula eucariótica afetados pela infecção com o vírus SV40 são variados e não foram completamente mapeados. Por conta da multiplicidade de alvos das proteínas do vírus SV40, decidiu-se por investigar as consequências da perturbação específica das proteínas p53 e pRb no remodelamento de matrizes de colágeno. Este objetivo foi alcançado através da expressão das proteínas E6 e E7 do papilomavírus humano (HPV) em fibroblastos BR-5, uma vez que a proteína E6 é capaz de induzir a degradação específica de p53, enquanto a proteína E7 inativa especificamente pRb [344]. A figura 15A mostra a análise por RT-PCR da expressão das proteínas E6 e E7 em células BR-5, confirmando a eficácia da transfecção. Para confirmar a funcionalidade da expressão conjunta de E6/E7 em fibroblastos BR-5, foram analisadas a expressão da proteína p53 e a desregulação do ciclo celular. As figuras 15B e 16B confirmam que a expressão de p53 foi suprimida e o tempo de geração de fibroblastos transfectados com HPV E6/E7 foi diminuído.

Para determinar o papel da proteína H-Ras no remodelamento de matriz 3D de colágeno, células BR-5 foram transfectadas com o alelo oncogênico, constitutivamente ativo, H-Ras^{V12}. Entretanto, a transfecção estável das células BR-5 com H-Ras^{V12} não foi possível, uma vez que os fibroblastos entravam em G₀, provavelmente em resposta a p53 e outros inibidores do ciclo celular, como p16^{INK4a} [345, 346]. Para sobrepor esta dificuldade, H-Ras^{V12} foi expressa em fibroblastos BR-5 já transfectados com E6/E7. A análise por *western blot* confirmou o aumento na expressão de p21ras (figura 15C) em fibroblastos BR-5 E6/E7 transfectados com H-Ras^{V12}, e experimento de imunofluorescência por microscopia óptica demonstrou que o nível de expressão é homogêneo entre a população transfectada (figura 16A). A análise funcional da expressão de H-Ras^{V12} foi realizada por meio do exame da curva de crescimento e do crescimento celular independente de contato (figuras 16B e 16C). Células transformadas com H-Ras^{V12} exibiram crescimento logarítmico em cultivos 2D mesmo após as linhagens BR-5 e BR-5 E6/E7 terem seu crescimento inibido, demonstrando a perda da inibição do crescimento por contato célula-célula nesta linhagem celular. Além disso, somente a linhagem de fibroblastos transfectada com H-Ras^{V12} apresentou crescimento efetivo em *soft-agar* (figura 16C), corroborando com dados da literatura que indicam

que o aumento na atividade de p21ras proporciona o crescimento celular independente de ancoragem [347, 348].

2.3. Aspectos morfológicos das linhagens celulares desenvolvidas

A figura 17 mostra micrografias de contraste de fase das linhagens celulares desenvolvidas e identificadas daqui em diante como BR-5 (para a linhagem de fibroblastos humanos pré-crise transfectados com *hTERT*, que serviu de base para transfecção das outras linhagens), BR-5 SV40-LT (para a linhagem BR-5 transfectada com o antígeno *large-T* do SV40), BR-5 E6/E7 (para a linhagem BR-5 transfectada com HPV E6 e E7) e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (para a linhagem BR-5 transfectada tanto com HPV E6/E7 quanto H-Ras^{V12}). Quando cultivadas em garrafas de poliestireno tratadas para cultivo, as linhagens apresentam morfologias parecidas à exceção da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12}. Nesta, as células não apresentam inibição do crescimento pelo contato (figura 16C), de modo que as células crescem em múltiplas camadas (figura 17).

Também foram analisadas as morfologias das linhagens celulares por microscopia de fluorescência, com marcações para microfilamentos e microtúbulos (figuras 18 e 19). Como mostrado na figura 17, em substratos 2D as células não apresentam modificações significativas na morfologia celular à exceção daquelas transfectadas com o alelo oncogênico de H-Ras (figura 18). Tanto células BR-5 E6/E7 (dado não mostrado) quanto células BR-5 SV40-LT apresentam padrões de microfilamentos e microtúbulos semelhantes à linhagem parental, BR-5, inclusive um alongamento e afinamento da morfologia celular quando tratadas com PDGF. Por outro lado, as células da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} apresentam morfologia mais alongada e afilada e menor expressão de fibras de tensão do que células de outras linhagens, independentemente do agonista empregado no cultivo.

A morfologia apresentada pelas células em matrizes 3D de colágeno também não diferiu substancialmente entre as linhagens, independentemente do agonista empregado (figura 019). Todos os mutantes apresentaram alterações morfológicas em função do tratamento com agonistas semelhantes às alterações observadas na linhagem parental, BR-5. Isto é, apresentaram inibição da extensão de projeções dendríticas quando tratadas com LPA ou SFB, e indução da formação dos dendritos quando tratadas

com PDGF. No entanto, ensaios morfométricos sugerem que as projeções dendríticas de fibroblastos BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} tratados com PDGF são significativamente maiores do que as projeções emitidas por fibroblastos das outras linhagens também tratados com PDGF (dado não mostrado).

2.4. Fibroblastos transfectados com *large-T* do SV40, HPV E6/E7 e/ou H-Ras^{V12} não apresentam menor capacidade de remodelamento de géis de colágeno do que aqueles da linhagem BR-5

Inicialmente os ensaios de remodelamento de matriz foram realizados pelo modelo FMC, no qual as células são misturadas a uma solução de colágeno que, após polimerização e formação do gel, é cultivada solta do substrato. O gel flutuante é então incubado em meio contendo agonista que induz o remodelamento. Surpreendentemente, a linhagem transfectada com o antígeno *large-T* do SV40 apresentou capacidade de remodelamento de géis de colágeno, pelo modelo FMC, idêntica a capacidade exibida por fibroblastos BR-5, independentemente do agonista empregado (figuras 20). A análise da dinâmica temporal de remodelamento no período de até 24 horas também não mostra diferenças significativas entre as amostras testadas (figura 21). Adicionalmente, o mesmo padrão de remodelamento de matrizes de colágeno do tipo I foi observado para os fibroblastos das linhagens BR-5 E6/E7 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (figuras 22B e 23). Portanto, as células BR-5 e seus mutantes apresentam habilidades idênticas de contração de géis de colágeno, e superiores à habilidade dos fibroblastos completamente transformados da linhagem SV589 (figura 24).

Um dos motivos para a observação de resultados tão intrigantes poderia ser a alta concentração de células na matriz de colágeno; isto é, a concentração seria tão alta que estaria atingindo um limiar no qual pequenas variações na capacidade de remodelamento das amostras estariam sendo mascaradas. A figura 25 mostra que à medida que a densidade celular é diminuída um padrão distinto de remodelamento induzido por diferentes agonistas aparece: o PDGF apresenta-se como um estímulo melhor do que LPA ou SFB. Entretanto, não há mudança significativa entre os padrões de remodelamento das diferentes linhagens testadas.

Para confirmar que o remodelamento de matrizes de colágeno flutuantes (modelo FMC) não difere entre fibroblastos BR-5 e seus mutantes, géis de colágeno com baixa densidade celular foram remodelados por 24 horas pelas diferentes linhagens e ainda assim não foram observadas diferenças significativas entre as amostras (figura 26).

No modelo FMC, o remodelamento da matriz depende principalmente de *rufflings* de membrana [119] mediados pela atividade de Rac [249]. Entretanto, este não é o único mecanismo de remodelamento que os fibroblastos utilizam. No modelo SMC, géis contendo células são cultivadas por 12 horas associadas ao substrato, tempo no qual as forças exercidas pelas células resultam no desenvolvimento de tensão isométrica na matriz. O remodelamento da matriz é medido então ao se soltar a matriz do substrato e cultivá-la por uma hora na presença de um agonista. Em oposição ao modelo FMC, no modelo SMC a atividade de contração do gel é principalmente dependente de vias de sinalização mediadas por ROCK, uma vez que o tratamento com Y-27632 inibe completamente o remodelamento induzido por LPA [196]. Assim, também foi investigada a capacidade de remodelamento de BR-5 e seus mutantes no modelo SMC. As figuras 22A e 27 mostram ensaios de SMC que confirmam a tese de que a perturbação das proteínas p53, pRB e H-Ras (pela transfecção com E6/E7 e H-Ras^{V12}) não são capazes de induzir alterações na habilidade de remodelamento de fibroblastos humanos pré-senescentes.

2.5. O bloqueio do crescimento por contato, mas não a densidade celular, diminui o remodelamento de géis de colágeno

Uma característica importante que distingue, *in vitro*, células normais daquelas transformadas é o bloqueio do crescimento por contato (do inglês, *growth-arrest by contact inhibition*). Enquanto células normais disparam vias de sinalização que induzem o bloqueio da proliferação celular quando o cultivo em 2D atinge certa densidade, um fenômeno chamado inibição por contato, células transformadas continuam a se dividir [349]. Considerando que células transfectadas com H-Ras^{V12} não tiveram o crescimento bloqueado pela densidade (figura 16B), questionou-se a hipótese da densidade celular

ou o bloqueio do crescimento influenciarem na capacidade de fibroblastos de remodelar géis de colágeno.

Para tal, células de diferentes linhagens foram plaqueadas em frascos de cultivo em 3 diferentes densidades iniciais. O ensaio foi desenhado de modo que após dois dias de incubação em condição padrão de cultivo as células BR-5 em maior densidade inicial entrariam em bloqueio do crescimento (estariam em G₀) enquanto todas as demais amostras não (figura 28A). Além disso, as células cultivadas das linhagens BR- E6/E7 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} teriam densidades finais bastante distintas no momento da coleta para os ensaios de remodelamento, mas não estariam em G₀. Observa-se que tanto em experimentos de FMC (figura 28B) quanto de SMC (figura 28C), células de uma mesma linhagem, porém advindas de cultivos com densidades distintas, apresentam habilidades de remodelamento similares. No entanto, a amostra da linhagem BR-5 com crescimento bloqueado (amostras com asteriscos nas figuras 28B e 28C) demonstrou perda significativa (entre 30 e 50%) na capacidade de contrair os géis de colágeno.

2.6. A expressão de H-Ras^{V12} potencializa a migração de fibroblastos em lamínulas recobertas com colágeno

Um dos fenótipos mais marcantes de células transformadas é a sua habilidade de migrar e invadir tecidos. Estudos cujo objetivo era descobrir a relevância da atividade das proteínas Ras no fenótipo migratório de diferentes tipos celulares, incluindo fibroblastos, demonstraram que a inibição da atividade de Ras suprime fortemente a atividade migratória. Por outro lado, se a atividade de Ras é aumentada pela expressão de alelos constitutivamente ativos, a migração celular é mais fortemente induzida [330, 331, 332, 333]. Como os resultados demonstravam que a expressão de H-Ras^{V12} não modificam a capacidade de fibroblastos humanos em remodelar géis de colágeno, a hipótese de que o mutante BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} apresentaria fenótipos de remodelação e migração desacoplados foi testada.

Inicialmente, a capacidade das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} de migrar em ensaios de *scratch-wound* sobre lamínulas de vidro adsorvidas com colágeno do tipo I, foi analisada (figuras 29-31). Como esperado, as células transfectadas com H-Ras^{V12} apresentaram aumento na habilidade migratória quando

comparadas às outras linhagens, independentemente do tratamento com agonistas. Também foi realizado ensaio com o objetivo de se demonstrar a velocidade média de migração de células BR-5 e BR-5 E6/E7 H-RasV12 em substratos 2D recobertos com colágeno do tipo I (figura 32). O resultado mostra que fibroblastos da linhagem BR-5 apresentam velocidade média de $21,1 \pm 12,5$ $\mu\text{m}/\text{hora}$ enquanto fibroblastos da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} apresentam velocidade quase 75% superior ($36,7 \pm 8,4$ $\mu\text{m}/\text{hora}$).

2.7. O alelo oncogênico de H-Ras induz ao aumento da habilidade migratória de fibroblastos cultivados em matrizes 3D de colágeno do tipo I

Para estudar a migração celular em matrizes 3D de colágeno foi empregado o modelo de *nested collagen matrix*, ou matriz aninhada [200]. Neste modelo, uma matriz de colágeno contraída por fibroblastos é inserida em uma nova matriz de colágeno puro, isto é, sem células. A matriz composta resultante é incubada na presença de agonistas que podem induzir a migração das células da matriz aninhada para a matriz externa. As figuras 33 e 34 mostram fotomicrografias de fibroblastos das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} em processo de migração na matriz de colágeno na presença de BSA, PDGF ou SFB. Assim como observado nos experimentos de *scratch-wound*, a estimativa da taxa e migração no modelo de matriz aninhada revela que as células BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} migram mais rapidamente do que células das linhagens BR-5 ou BR-5 E6/E7, principalmente nos tratamentos com BSA, LPA e SFB onde as células que não têm o alelo H-Ras^{V12} migram muito pouco (figura 35).

2.8. A migração de fibroblastos humanos em matrizes aninhadas pode ser inibida por S1P e inibidores de p38 MAP quinase e Rho quinase

O lipídio S1P, um dos componentes de soros bovinos e humanos, já foi demonstrado como importante inibidor da migração de fibroblastos BR-5 tanto em substratos recobertos com colágeno do tipo I, quanto em matrizes 3D também de colágeno [186]. Por outro lado, as proteínas p38 MAP quinase [270, 333] e Rho quinase

[165, 200] foram demonstradas como essenciais na migração celular em substratos 3D. A hipótese de que as transfecções com E6/E7 e H-RasV12 afetem a regulação das vias de S1P, p38 MAP quinase e Rho quinase na migração celular em matrizes 3D foi testada pelo tratamento das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7 e BR-5 E6/E7 H-RasV12 com S1P, SB202190 (inibidor de p38 MAP quinase), e Y27632 (inibidor de Rho quinase). A figura 36 mostra que os três tratamentos inibiram fortemente a migração das três linhagens celulares, independentemente se PDGF ou SFB fossem empregados como agonistas do fenômeno. De fato, na maioria dos casos a inibição exibida foi maior do que o estímulo dos agonistas, de modo que as taxas de migração na presença dos inibidores ficaram abaixo do nível basal de migração (migração na presença de BSA apenas) das linhagens testadas.

2.9. A morfologia das células migratórias das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} é semelhante

A análise da morfologia por imunofluorescência de microfilamentos sugere que não há diferenças significativas entre os fenótipos migratórios de fibroblastos das três linhagens estudadas, nem mesmo entre células tratadas com agonistas distintos (figura 37). Em todas as amostras estudadas a variação entre fenótipos de uma mesma amostra é, aparentemente, maior do que a variação observada entre amostras distintas (seja em comparações entre agonistas ou entre linhagens celulares). Entre os fenótipos observados destacam-se células polarizadas e longilíneas com uma ou duas (em alguns casos incomuns mais de duas) projeções de membrana mais pronunciadas na extremidade anterior das células (*leading edges*). Praticamente todas estas projeções anteriores proeminentes apresentam pequenas ramificações ao longo de suas extensões, mas principalmente em suas extremidades. Frequentemente observado em fibroblastos migratórios tratados com SFB, embora incomum de um modo geral, é a presença de um prolongamento de membrana posterior à localização nuclear (*trailing edge*).

2.10. A migração de fibroblastos humanos em matrizes aninhadas ocorre após um período de remodelamento da matriz externa

A migração em matrizes aninhadas das células BR-5, BR-5 E6/E7 e BR-5 E6/E7 H-RasV12 segue um padrão muito peculiar no que tange a relação entre o remodelamento da matriz externa e o translocamento das células [291]. A observação da migração ao microscópio ao longo do período de 16 horas de incubação demonstra que as células só iniciam a migração celular após uma determinada fase (fase *lag*) que varia entre 4 e 5 horas após o início da incubação com PDGF. Considerada esta observação, a hipótese de que a migração celular dependia de um remodelamento prévio da matriz externa foi estabelecida. Para testar esta hipótese, foram realizadas microscopias de *time-lapse* das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7 e BR-5 E6/E7 H-RasV12 em matrizes aninhadas de colágeno. Além disso, a velocidade do translocamento da matriz externa e das células foi quantificada.

As figuras 38 e 39 (vídeos 1-4) mostram que a migração dos fibroblastos só ocorre após uma fase *lag* caracterizada por um fluxo centrífugo (em direção à matriz aninhada), de velocidade variável, do colágeno na matriz externa. Conforme demonstrado na figura 35, os fibroblastos com alelos oncogênicos de H-Ras demonstram maior taxa de migração do que fibroblastos da linhagem parental (BR-5). Além disso, a taxa de migração na presença de PDGF (figura 38) é superior à taxa observada na presença de SFB (figura 39). A microscopia de *time-lapse* de células da linhagem BR-5 E6/E7 é similar à da linhagem parental (dado não mostrado). Um fenômeno que por vezes aparece nas microscopias de *time-lapse* de matrizes aninhadas é a movimentação centrífuga da matriz interna, mas sua observação ou não é independente de tratamentos com agonistas ou linhagens celulares, e pode variar em regiões distintas de uma mesma amostra.

A quantificação da velocidade de translocamento das células e do colágeno da matriz externa demonstra que a fase *lag* (fase inicial onde não se observa migração celular) corresponde ao período de maior velocidade de translocamento do colágeno da matriz externa na direção da matriz aninhada, independentemente da linhagem ou agonista empregado (figuras 40 e 41B). Logo após o início do processo de migração celular, a velocidade do fluxo centrífugo de colágeno diminui a um nível basal (constante) após aproximadamente 7 horas de incubação (considerando o período total

do experimento de 16 horas). Este nível basal é maior (aproximadamente 10 $\mu\text{m}/\text{hora}$) em células da linhagem BR-5 incubadas em PDGF do que nas outras células e agonistas testados (menores do que 5 $\mu\text{m}/\text{hora}$) (figura 40A). Já a média da velocidade dos fibroblastos migratórios aumenta até um patamar de aproximadamente 40 $\mu\text{m}/\text{hora}$ após 7-9 horas de incubação em todas as condições testadas, à exceção dos fibroblastos BR-5 tratados com SFB que só iniciam uma pequena migração após 9 horas de incubação (figura 41A). É importante esclarecer que apesar da variação entre amostras ser grande (vide valores de desvios padrão) o padrão que indica o início da migração celular após o declínio do translocamento do colágeno externo é bastante consistente.

2.11. A migração de fibroblastos humanos em géis de colágeno do tipo I é dependente do grau de remodelamento da matriz

Como a migração em matrizes aninhadas só ocorre após uma fase *lag* onde há intenso remodelamento da matriz externa, formulou-se a hipótese de que a diferença entre as densidades das matrizes aninhada e externa poderiam inviabilizar a migração celular por período até que a densidade (ou resistência) da matriz externa se tornasse semelhante à da matriz aninhada. Assim, em um período inicial do ensaio as células tracionariam a matriz externa na tentativa de migrar porém a flacidez desta matriz faria com que ela fosse puxada em direção às células. A medida que a matriz externa fosse retesada, sua resistência interna aumentaria até um limiar no qual se tornasse semelhante à resistência da matriz aninhada, permitindo assim a migração celular na direção da matriz externa. Para se testar esta hipótese, as matrizes internas foram remodeladas por períodos distintos de modo a se obter géis em densidades crescentes. Se a hipótese apresentada fosse correta, as células teriam maior dificuldade de migrar para a matriz externa quando a diferença de densidade entre matrizes fosse maior.

A figura 42 mostra a área de matrizes remodeladas por 6, 24 ou 48 horas. A estimativa da densidade de colágeno nas matrizes remodeladas tratadas com PDGF foi de aproximadamente 11-12 mg/mL (em matrizes remodeladas por 6 horas), 20-24 mg/mL (remodelamento por 24 horas) e 28-31 mg/mL (remodelamento por 48 horas), independentemente da linhagem celular empregada. Estas matrizes foram então empregadas como matrizes aninhadas para testar a hipótese descrita acima. Com efeito,

as matrizes com células continuam sendo remodeladas mesmo após o aninhamento, de modo que após 16 horas de incubação como matrizes aninhadas estes géis apresentam densidades estimadas de 11-12 mg/mL (em matrizes remodeladas por 6 horas), 22-24 mg/mL (remodelamento por 24 horas) e 35-39 mg/mL (remodelamento por 48 horas).

A figura 43 mostra a migração de células das linhagens BR-5 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} após remodelamento das matrizes aninhadas por 6, 24 ou 48 horas. Observa-se que fibroblastos da linhagem BR-5 têm sua capacidade migratória diminuída a medida que o tempo de remodelamento aumenta, alcançando até 90% de inibição quando a matriz aninhada é remodelada por 48 horas. Fibroblastos transfectados com o alelo oncogênico de H-Ras também apresentam menor migração quando a matriz é remodelada por 24 ou 48 horas mas, ao contrário da linhagem parental, a diminuição na taxa de migração é de apenas 25-50% tanto em matrizes remodeladas por 24 quanto em 48 horas. Esta inibição parcial é observada não somente em ensaios na presença de PDGF, mas também em experimentos com SFB ou BSA (figura 44).

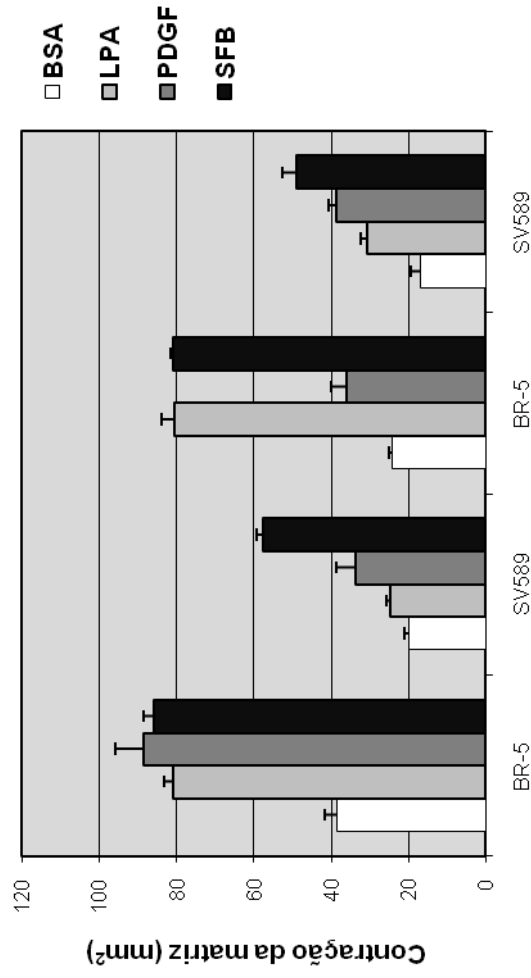


Figura 13. A linhagem de células transformadas SV589 exibe habilidade reduzida de remodelamento de géis de colágeno do tipo I em relação à linhagem de fibroblastos normais, BR-5. Células BR-5 e SV589 foram coletadas e semeadas em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz para ensaios de remodelamento de matriz. Para ensaios de *floating matrix contraction* (FMC), géis flutuantes foram incubados por 4 horas a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (barras brancas); DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e LPA 5nM (barras cinza claras); DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (barras cinza escuras); ou DMEM contendo SFB 10% (barras pretas). Para ensaios de *stressed matrix contraction* (SMC), géis fixados ao substrato foram incubados por 24 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%, lavados com DMEM puro e incubados por mais uma hora a 37°C como géis flutuantes nas mesmas condições empregadas no ensaio de FMC. Ao fim das incubações as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, digitalizadas e a extensão da contração de cada gel foi estimada em *software* MetaVue 6.2r6 subtraindo a área de cada gel de 113 mm^2 (valor equivalente à área original dos géis). Os dados mostrados são médias aritméticas e desvio padrão de um experimento em triplicata e são representativos de três ensaios independentes.

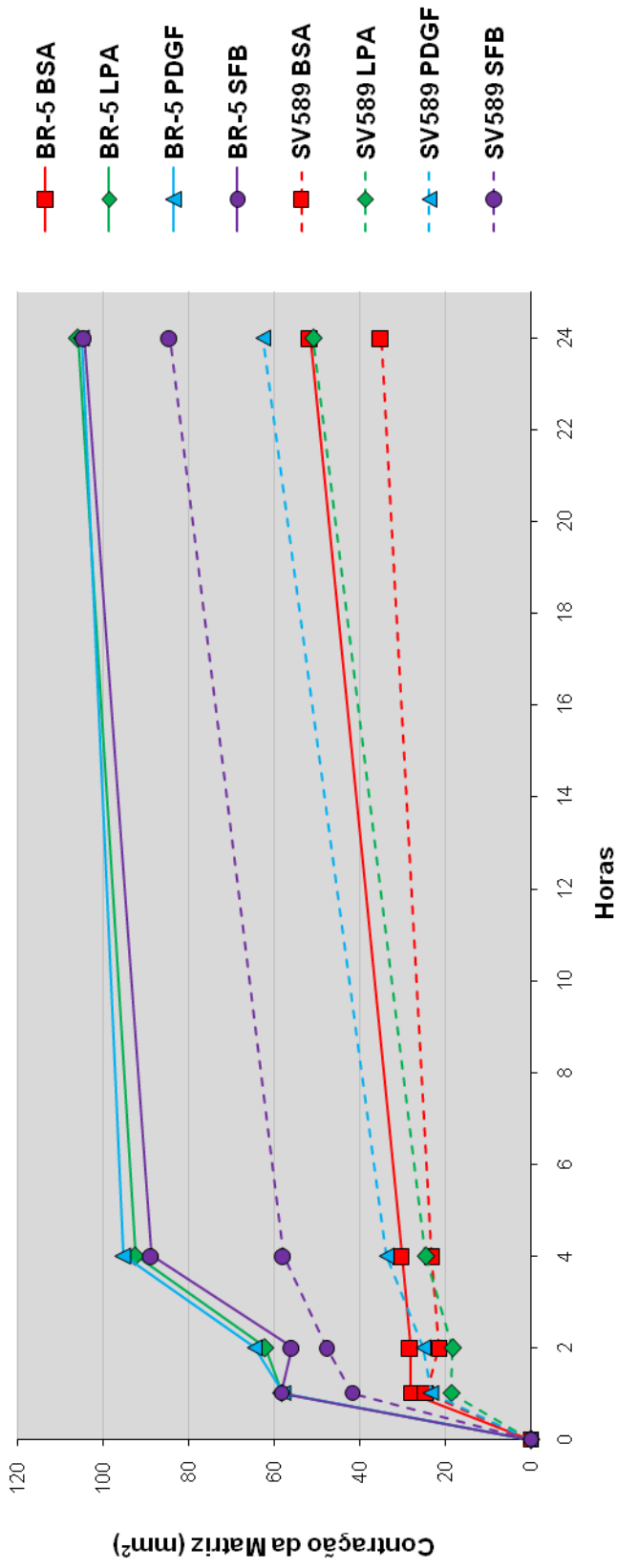


Figura 14. A linhagem de células transformadas SV589 **exibe cinética de remodelamento de géis de colágeno do tipo I reduzida em relação à linhagem de fibroblastos normais, BR-5.** Fibroblastos pré-senescentes transfectados com hTERT (BR-5; linhas contínuas) e fibroblastos estabelecida transformados com vírus SV40 (SV589; linhas pontilhadas) foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz para ensaios *floating matrix contraction* (FMC). Géis flutuantes foram incubados a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (quadrados vermelhos), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e LPA 5nM (losangos verdes), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (triângulos azuis), ou DMEM contendo SFB 10% (círculos violeta). Após 1, 2, 4 e 24 horas de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, digitalizadas e a extensão da contração de cada gel foi estimada em *software* MetaVue 6.2r6 subtraindo a área de cada gel de 113 mm^2 (valor equivalente à área original dos géis). Os dados mostrados são representativos de três experimentos independentes.

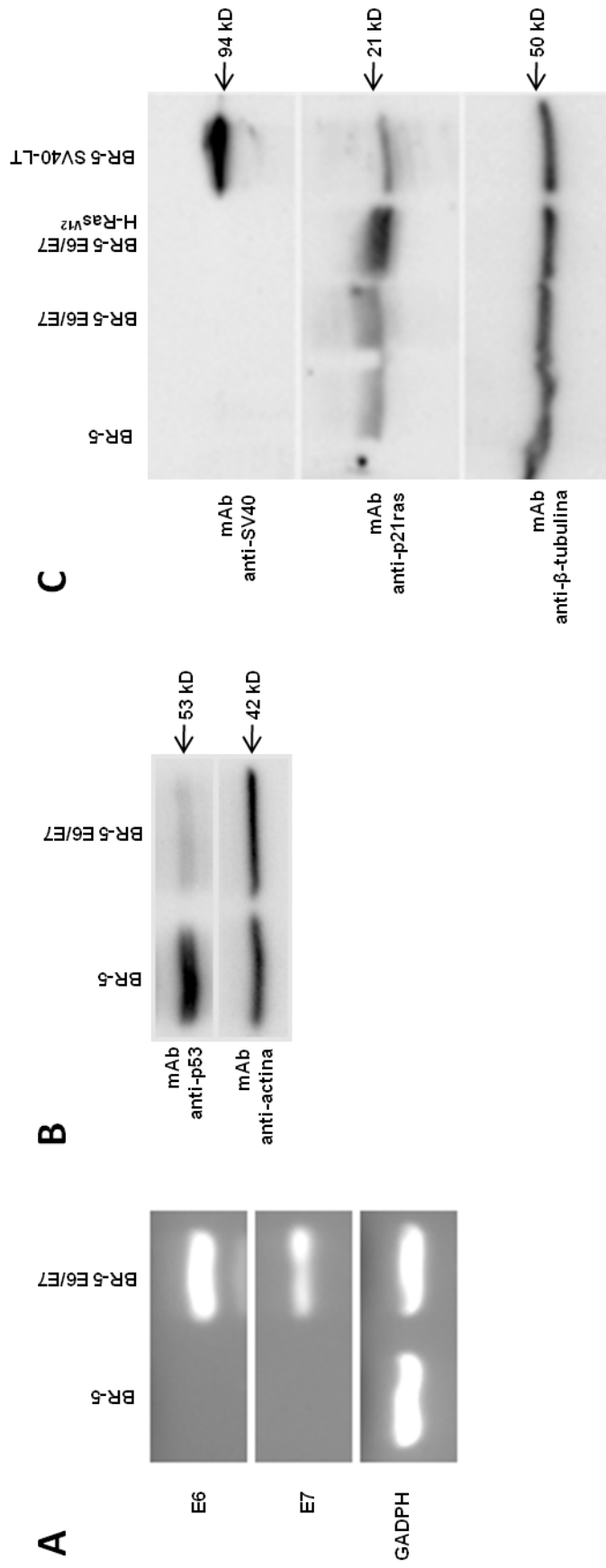


Figura 15. **Controles da transfecção de células BR-5 com HPV E6/E7, H-Ras^{V12} e SV40-LT.** (A) Extratos de RNA das linhagens BR-5 ou BR-5 E6/E7 foram analisados por RT-PCR quanto a expressão de RNAm das proteínas E6 e E7. *Primers* para o RNAm de GAPDH foram utilizados como controle positivo da reação de RT-PCR. (B) Extratos de proteínas das linhagens BR-5 e BR-5 E6/E7 foram analisadas por *immunoblotting* quanto a expressão da proteína p53 com o emprego de anticorpo monoclonal contra esta proteína. O controle da carga de proteínas aplicada no gel foi realizado por *immunoblotting* para actina. (C) Extratos de proteínas das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7, BR-5 SV40-LT foram analisadas por *immunoblotting* quanto a expressão das proteínas SV40 *large-T* e p21ras com o emprego de anticorpos monoclonais contra estas proteínas. O controle da carga de proteínas aplicada no gel foi realizado por *immunoblotting* para beta-tubulina. Os dados mostrados representativos de três ensaios independentes.

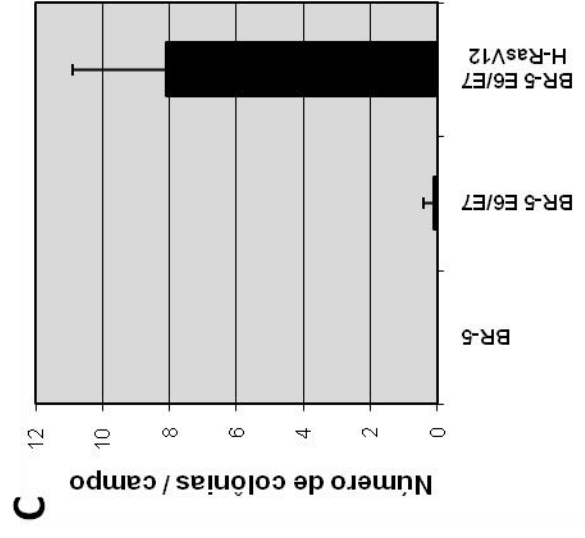
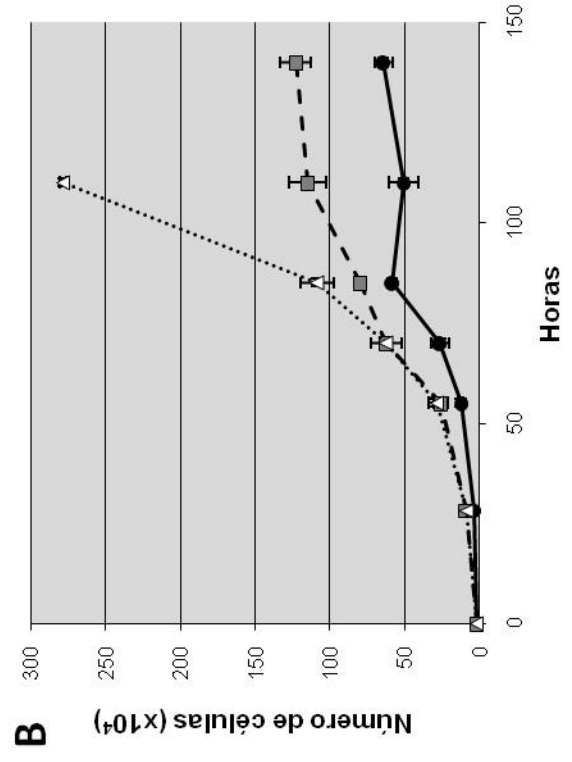
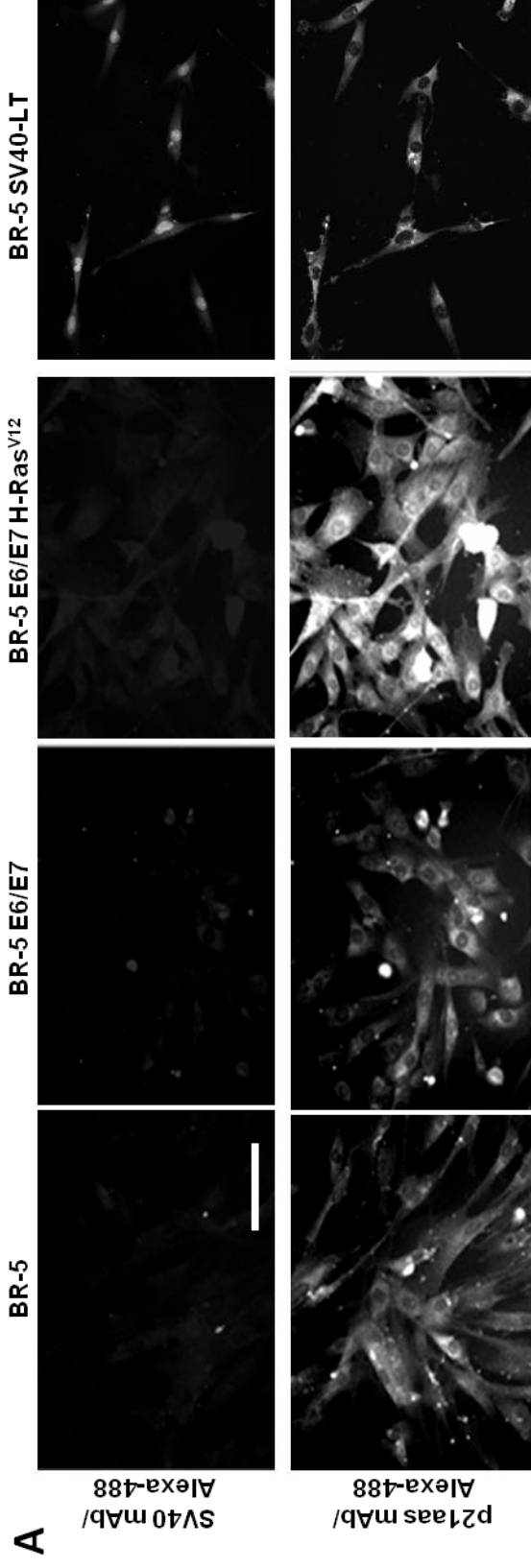


Figura 16. **Controles da transfecção de células BR-5 com HPV E6/E7, H-Ras^{v12} e SV40-LT.** (A) Células das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7, BR-5 E6/E7 H-Ras^{v12} e BR-5 SV40-LT foram incubadas em DMEM contendo SFB 10% por 24 horas sobre lamínulas de vidro. Em seguida foram fixadas com formaldeído 3,7 % e imunomarcadas com anticorpos primários monoclonais anti-SV40 (1:100) ou anti-p21ras (1:100) e anticorpos secundários complexados a alexa-488 (1:150). Os dados mostrados são representativos de quatro ensaios independentes. Barra: 50 µm. (B) Células das linhagens BR-5 (círculos pretos), BR-5 E6/E7 (quadrados cinzas) ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{v12} (triângulos brancos) foram coletadas, semeadas em placas de 6 poços na concentração de 2×10^4 células/poço e incubadas em DMEM contendo SFB 10% por 28, 55, 70, 85, 110 e 140 horas. Após a incubação as amostras foram “tripsinizadas” e o número de células recolhido de cada poço foi estimado por contagem em câmara de Neubauer. Os dados mostrados são médias aritméticas e desvios padrão de um experimento realizado em triplicata e representativo de dois ensaios independentes. (C) Células das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7 ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{v12} foram coletadas e semeadas em placas de 6 poços contendo *soft-agar* na concentração de 2×10^4 células/poço por 2 semanas a 37°C . Ao final do período de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7% e o crescimento independente de ancoragem foi estimado ao microscópio de contraste de fase contando-se o número de colônias celulares em 10 campos aleatórios por poço. Os dados mostrados são médias aritméticas e desvios padrão de um experimento realizado em triplicata e representativo de dois ensaios independentes.

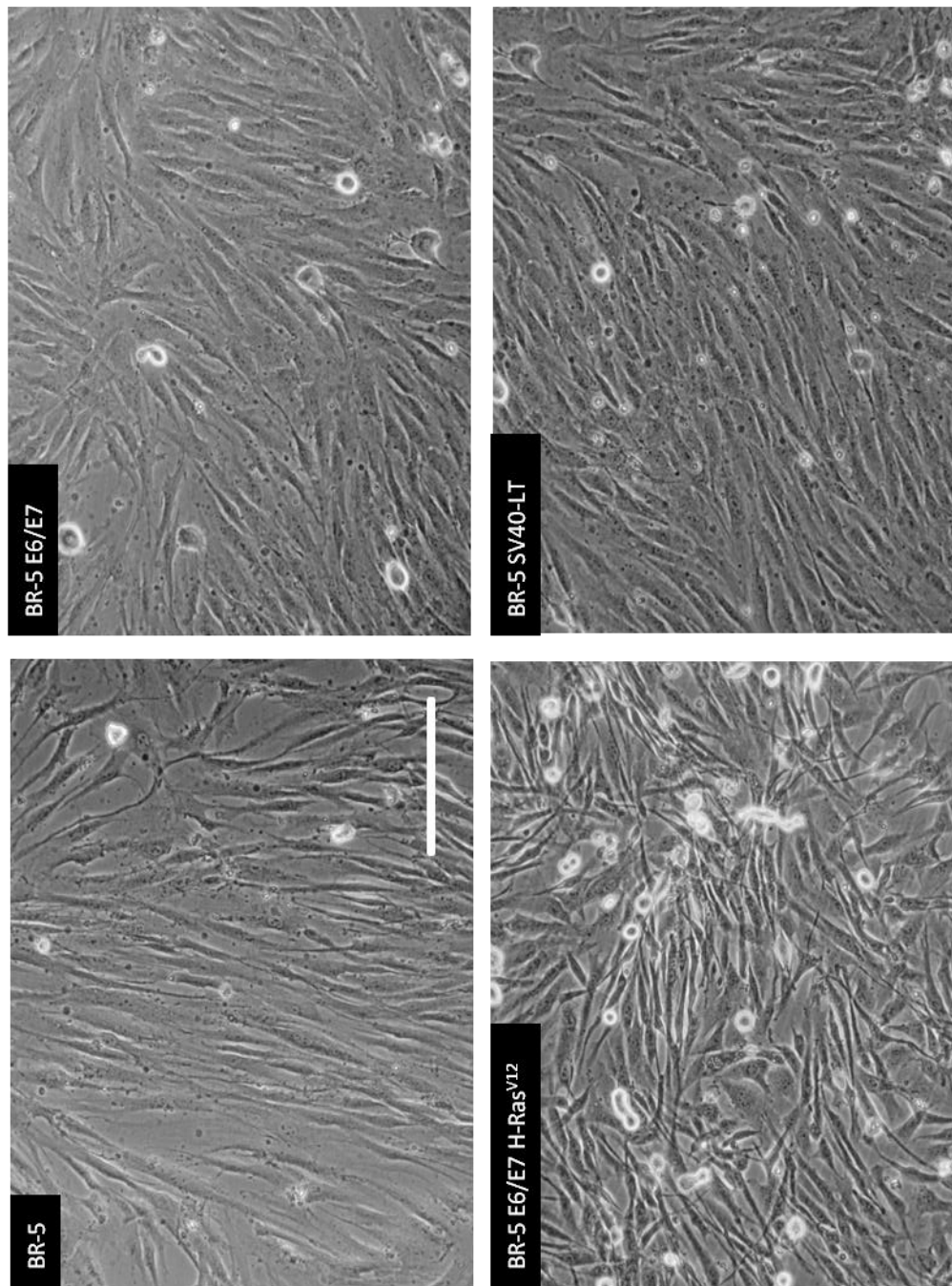


Figura 17. **A linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} apresenta morfologia alterada.** Micrografias de contraste de fase das culturas de fibroblastos BR-5, BR-5 E6/E7, BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} e BR-5 SV40-LT mantidas em DMEM suplementado com SFB 10% em frascos de cultura de poliestireno tratado de 75 mm² (T75). As imagens foram captadas por *software* de aquisição MetaVue 6.2i6 com auxílio de uma câmara COOL Snap ES acoplada a microscópio Nikon Eclipse E600. Barra: 100 µm. Barra: 100 µm.

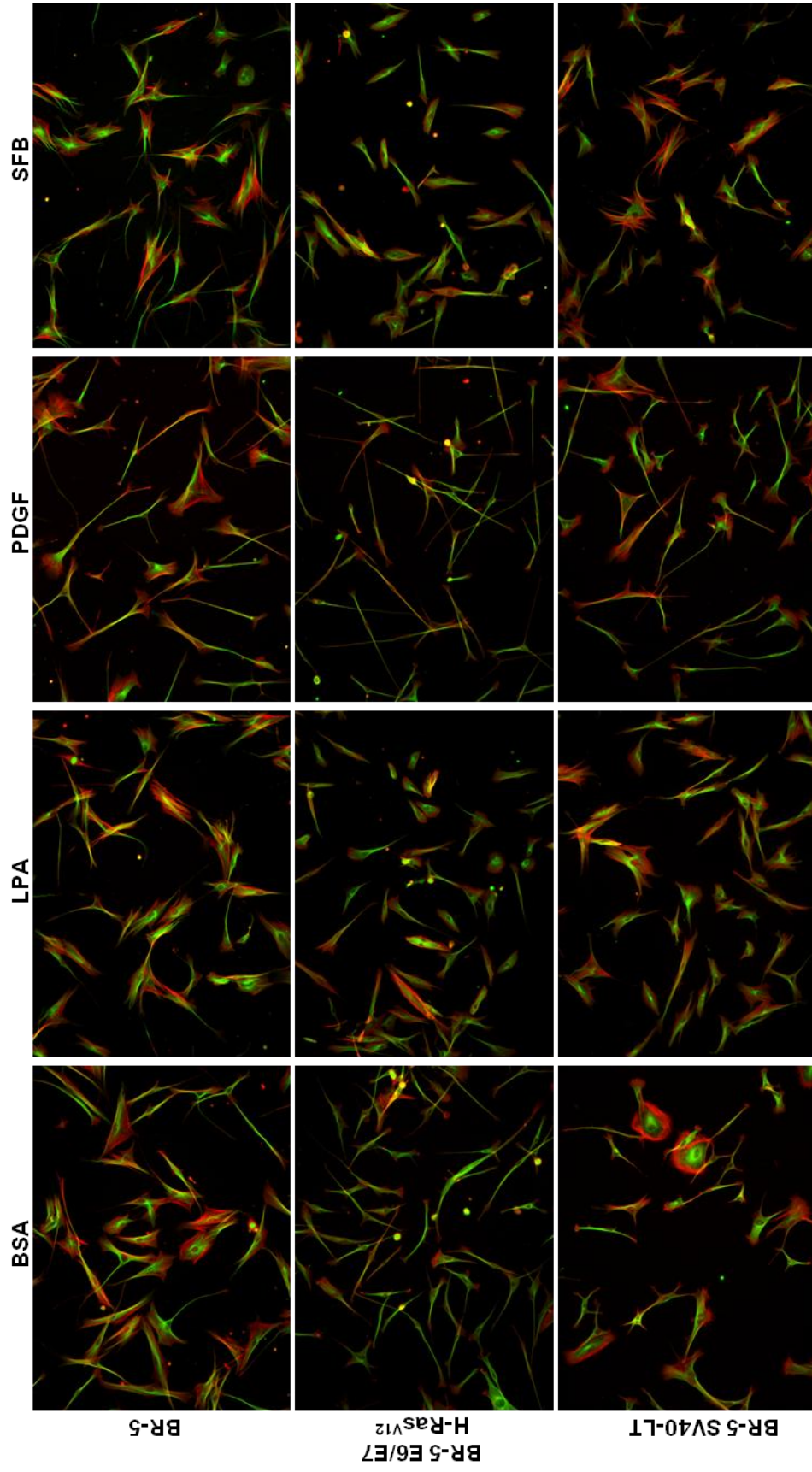


Figura 18. Morfologia dos microfilamentos e microtúbulos de fibroblastos aderidos a colágeno do tipo I adsorvido em substrato 2D. Fibroblastos das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} e BR-5 SV40-LT foram coletados e semeados sobre lamínulas de vidro recobertas com 50 µg de colágeno do tipo I na concentração de 2.10⁴ células/lamínula. As amostras foram cultivadas por 6 horas a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (BSA), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e LPA 5nM (LPA), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (PDGF), ou DMEM contendo SFB 10% (SFB). Ao fim do período de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, tratadas com faloidina-alexa-594 1:150(vermelho), *mouse* mAb anti-beta-tubulina 1:150 e mAb anti-*mouse*-alexa 488 1:150 (verde), e montadas entre lâmina e lamínula com o auxílio de Fluoromount G. As imagens foram captadas por *software* de aquisição MetaVue 6.2r6 com auxílio de uma câmara COOL Snap ES acoplada a microscópio Nikon Eclipse E600. Os dados mostrados são representativos de três ensaios independentes. Barra: 100 µm.

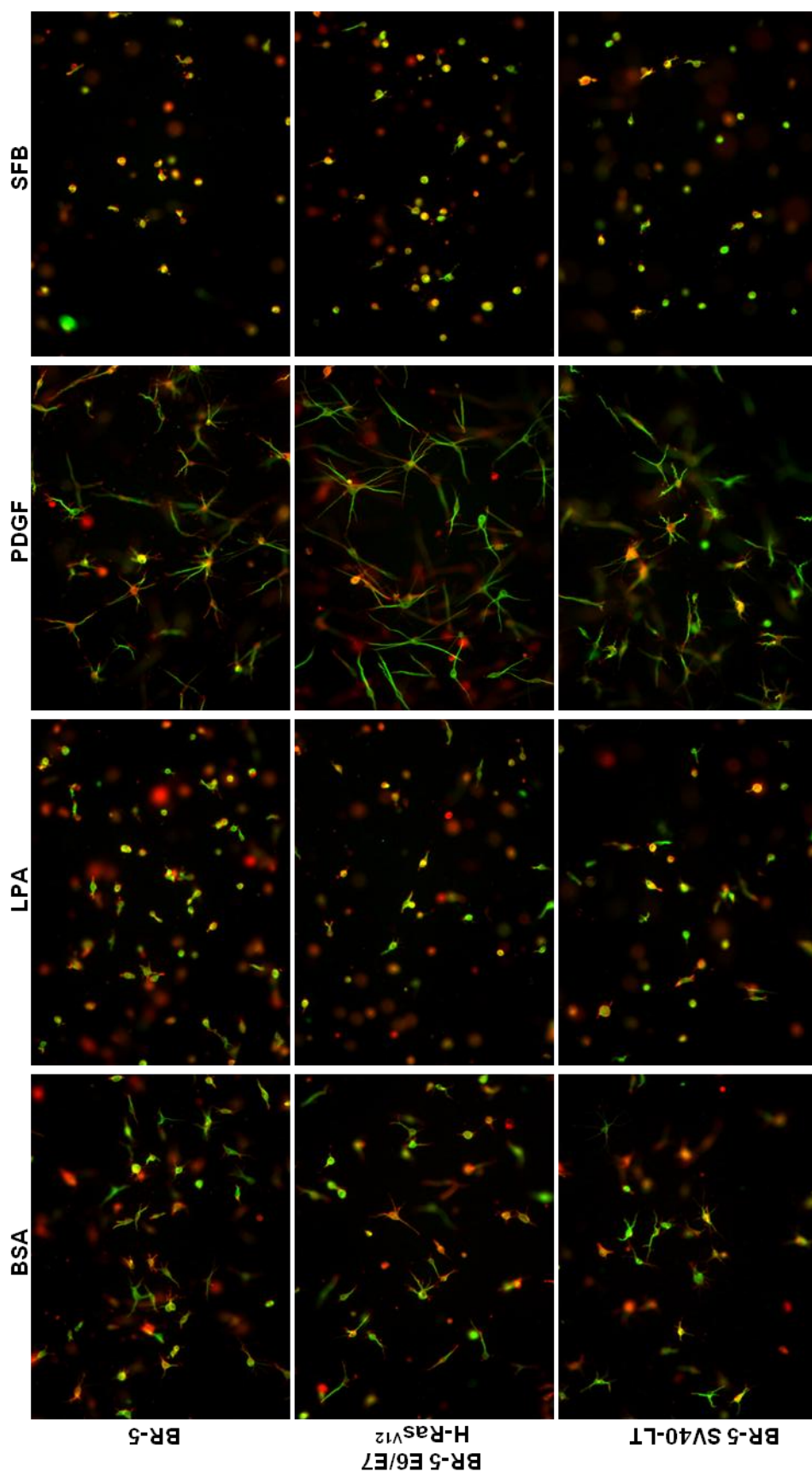


Figura 19. Morfologia dos microfilamentos e microtúbulos de fibroblastos cultivados em géis de colágeno do tipo I. Fibroblastos das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} e BR-5 SV40-LT foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^4 células/matriz. As amostras foram cultivadas por 6 horas a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (BSA), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e LPA 5nM (LPA), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (PDGF), ou DMEM contendo SFB 10% (SFB). Ao fim do período de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, tratadas com faloidina-alexa-594 1:150(vermelho), *mouse* mAb anti-beta-tubulina 1:150 e mAb anti-*mouse*-alexa 488 1:150 (verde), e montadas entre lâmina e lamínula com o auxílio de Fluoromount G. As imagens foram captadas por *software* de aquisição MetaVue 6.2r6 com auxílio de uma câmara COOL Snap ES acoplada a microscópio Nikon Eclipse E600. Os dados mostrados são representativos de três ensaios independentes. Barra: 100 µm.

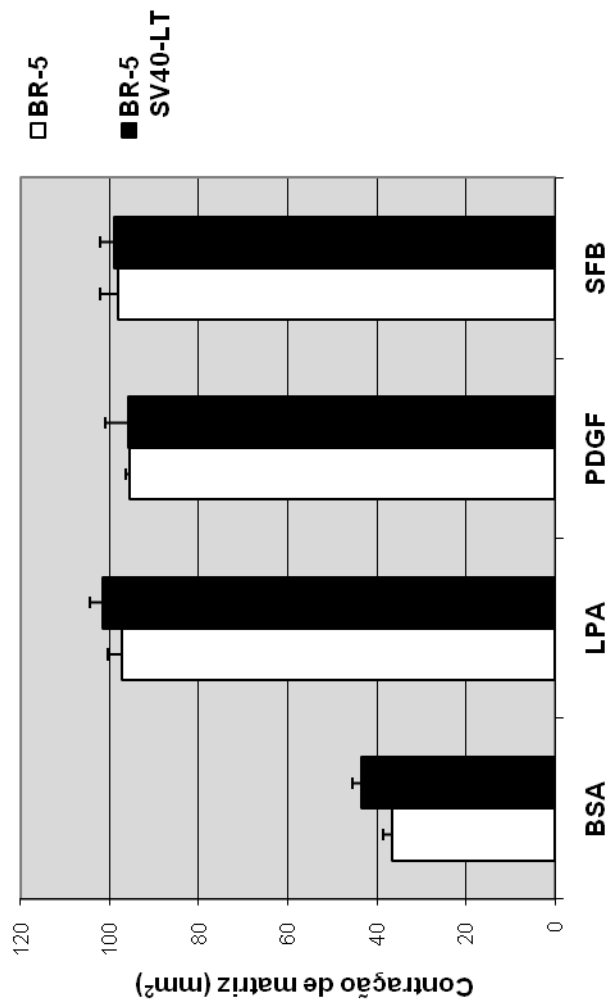


Figura 20. A linhagem de células BR-5 SV40-LT exibe habilidade de remodelamento de géis de colágeno do tipo I equivalente a da linhagem parental, BR-5. Fibroblastos BR-5 (barras brancas) e fibroblastos BR-5 transfectados com o antígeno SV40 *large-T* (BR-5 SV40-LT; barras pretas) foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz para ensaios *floating matrix contraction* (FMC). Géis flutuantes foram incubados a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (BSA), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e LPA 5nM (LPA), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (PDGF), ou DMEM contendo SFB 10% (SFB). Após 1, 2, 3, 4 e 24 horas de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, digitalizadas e a extensão da contração de cada gel foi estimada em *software* MetaVue 6.2r6 subtraindo a área de cada gel de 113 mm^2 (valor equivalente à área original dos géis). Os dados mostrados são representativos de três ensaios independentes.

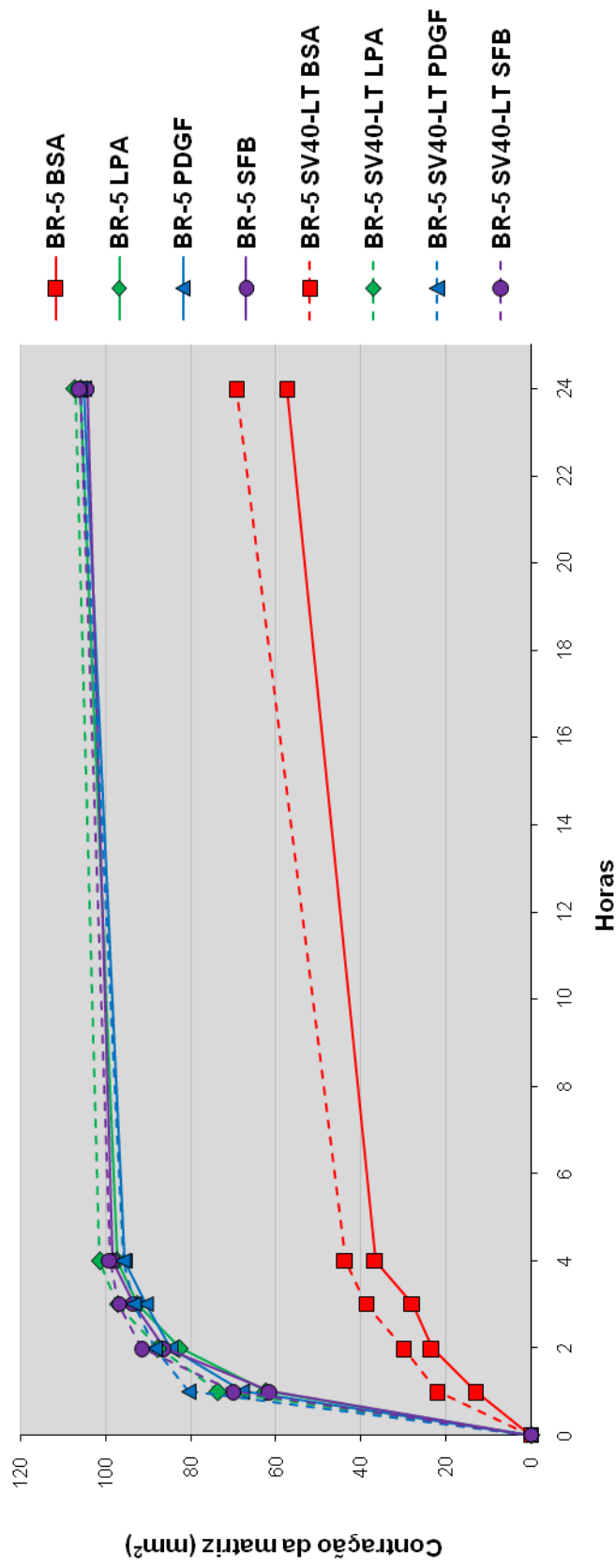


Figura 21. A linhagem de células BR-5 SV40-LT exibe cinética de remodelamento de géis de colágeno do tipo I equivalente a da linhagem parental, BR-5. Fibroblastos BR-5 (linhas inteiras) e fibroblastos BR-5 transfectados com o antígeno SV40 *large-T* (BR-5 SV40-LT; linhas pontilhadas) foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz para ensaios *floating matrix contraction* (FMC). Géis flutuantes foram incubados a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (quadrados vermelhos), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e LPA 5nM (losangos verdes), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (triângulos azuis), ou DMEM contendo SFB 10% (círculos violetas). Após 1, 2, 3, 4 e 24 horas de incubação as amostras foram fixadas com formaldeído 3,7 %, digitalizadas e a extensão da contração de cada gel foi estimada em *software* MetaVue 6.2r6 subtraindo a área de cada gel de 113 mm^2 (valor equivalente à área original dos géis). Os dados mostrados são representativos de três ensaios independentes.

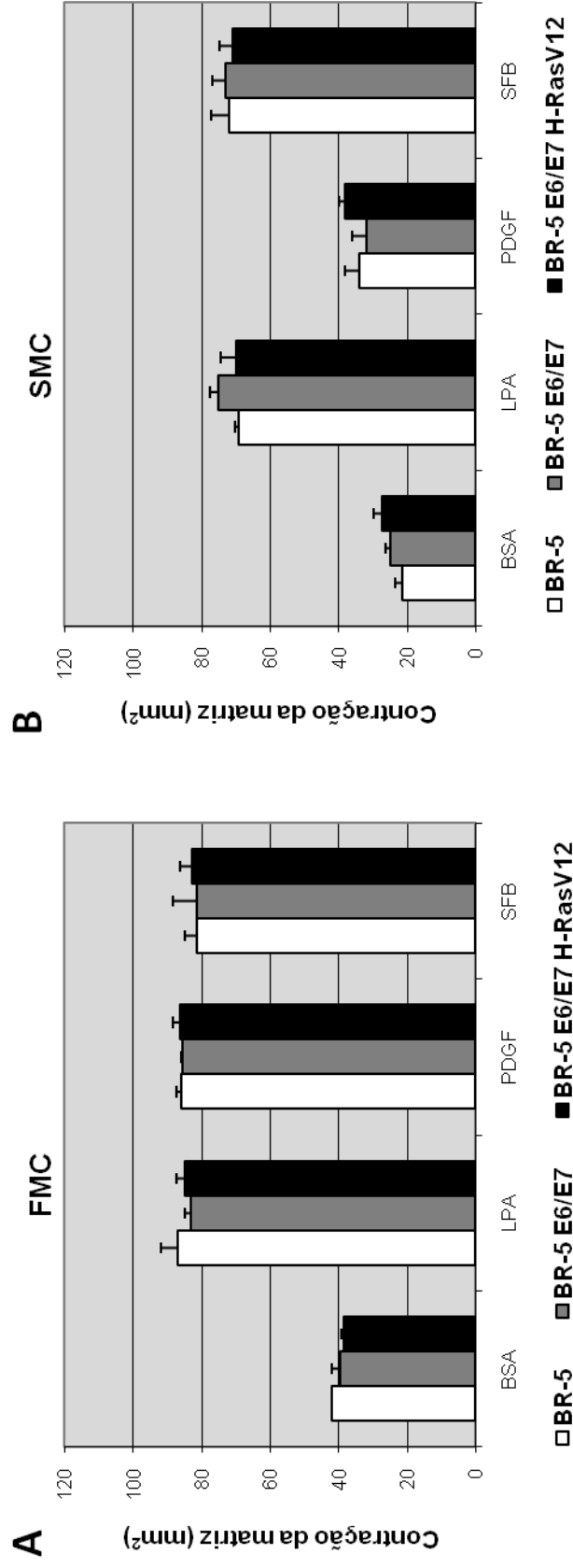


Figura 22. As linhagens BR-5 E6/E7 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} exibem habilidades de remodelamento de géis de colágeno do tipo I equivalentes a da linhagem parental, BR-5. Fibroblastos das linhagens BR-5 (barras brancas), BR-5 E6/E7 (barras cinza) ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (barras pretas) foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz para ensaios de remodelamento de matriz. Para ensaios de *floating matrix contraction* (A), géis flutuantes foram incubados por 4 horas a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (BSA), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e LPA 5nM (LPA), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (PDGF), ou DMEM contendo SFB 10% (SFB). Para ensaios de *stressed matrix contraction* (B), géis fixados ao substrato foram incubados por 24 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%, lavados com DMEM puro e incubados por mais uma hora a 37°C como géis flutuantes nas mesmas condições empregadas no ensaio de FMC. Ao fim das incubações as amostras foram fixadas com formaldeído 3,7 %, digitalizadas e a extensão da contração de cada gel foi estimada em *software* MetaVue 6.2.16 subtraindo a área de cada gel de 113 mm² (valor equivalente à área original dos géis). Os dados mostrados são médias aritméticas e desvios padrão de experimentos em triplicata e representativos de três ensaios independentes.

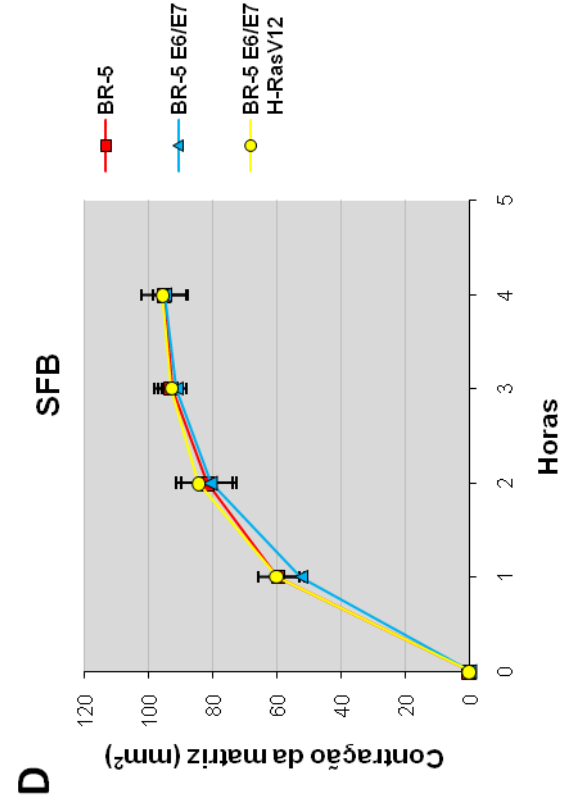
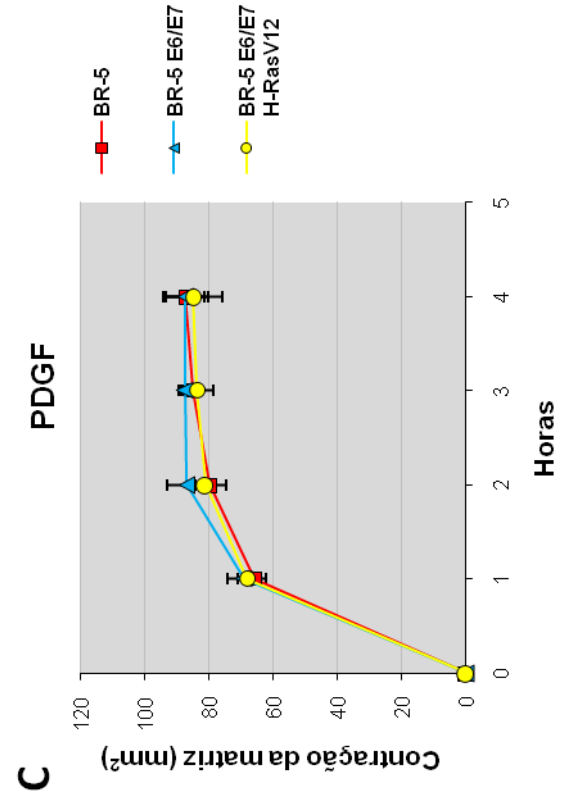
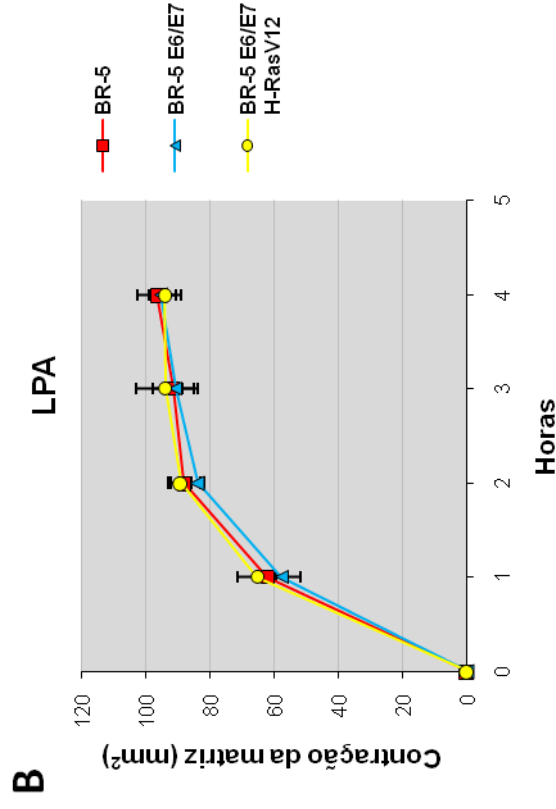
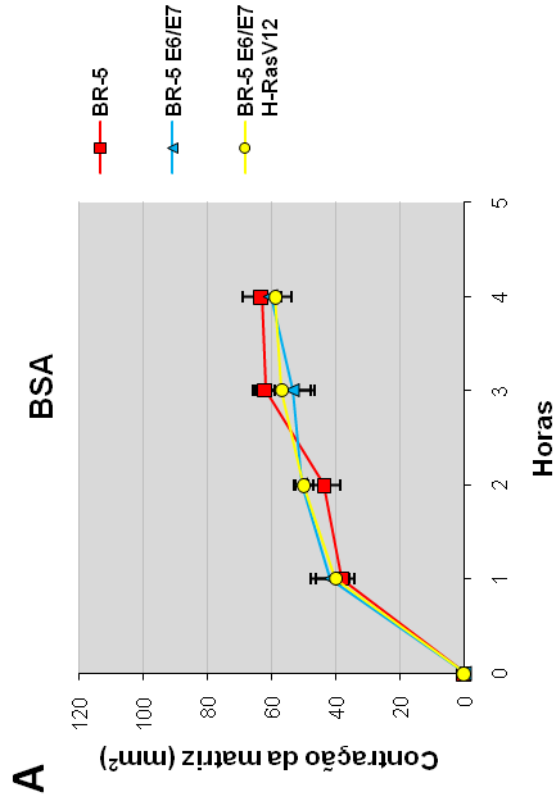


Figura 23. As linhagens BR-5 E6/E7 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} exibem cinética de remodelamento de géis de colágeno do tipo I equivalentes a da linhagem parental, BR-5. Fibroblastos das linhagens BR-5 (quadrados vermelhos), BR-5 E6/E7 (triângulos azuis) ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (círculos amarelos) foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz para ensaios de *floating matrix contraction*. Géis flutuantes foram incubados por 1, 2, 3 ou 4 horas a 37°C em: (A) DMEM contendo 5 mg/ml de BSA, (B) DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e LPA 5nM, (C) DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF, ou (D) DMEM contendo SFB 10%. Ao fim das incubações as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, digitalizadas e a extensão da contração de cada gel foi estimada em *software* MetaVue 6.2r6 subtraindo a área de cada gel de 113 mm² (valor equivalente à área original dos géis). Os dados mostrados são médias aritméticas e desvios padrão de experimentos em triplicata e representativos de três ensaios independentes.

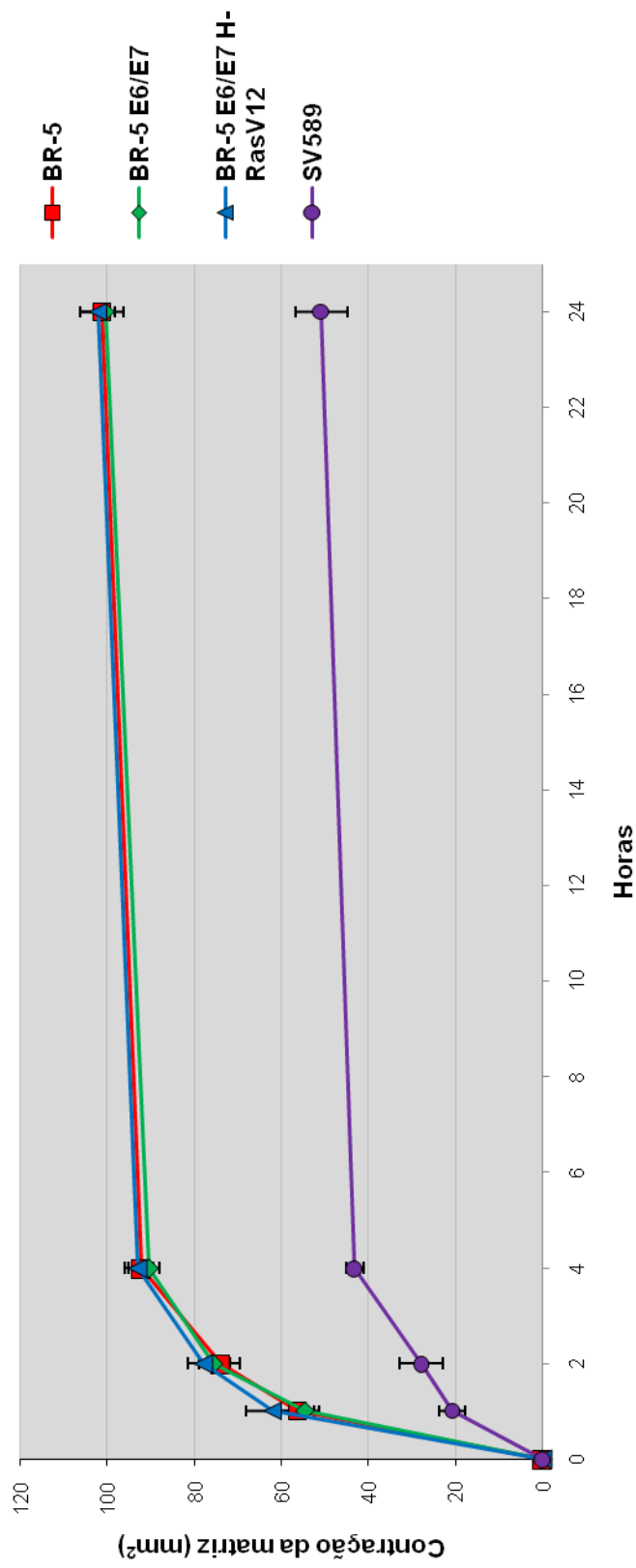


Figura 24. A cinética de remodelamento de géis de colágeno do tipo I por tratamento com PDGF é semelhante entre as linhagens mutantes de BR-5, e reduzida apenas na linhagem transformada SV589. Fibroblastos das linhagens BR-5 (linha vermelha), BR-5 E6/E7 (linha verde), BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (linha azul) ou SV589 (linha violeta) foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz para ensaios *floating matrix contraction* (FMC). Géis flutuantes foram incubados em DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF a 37°C e após 1, 2, 4 e 24 horas as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, digitalizadas e a extensão da contração de cada gel foi estimada em *software* MetaVue 6.2r6 subtraindo a área de cada gel de 13 mm² (valor equivalente à área original dos géis). Os dados mostrados são médias e desvios padrão de um experimento em triplicata e representativos de três ensaios independentes.

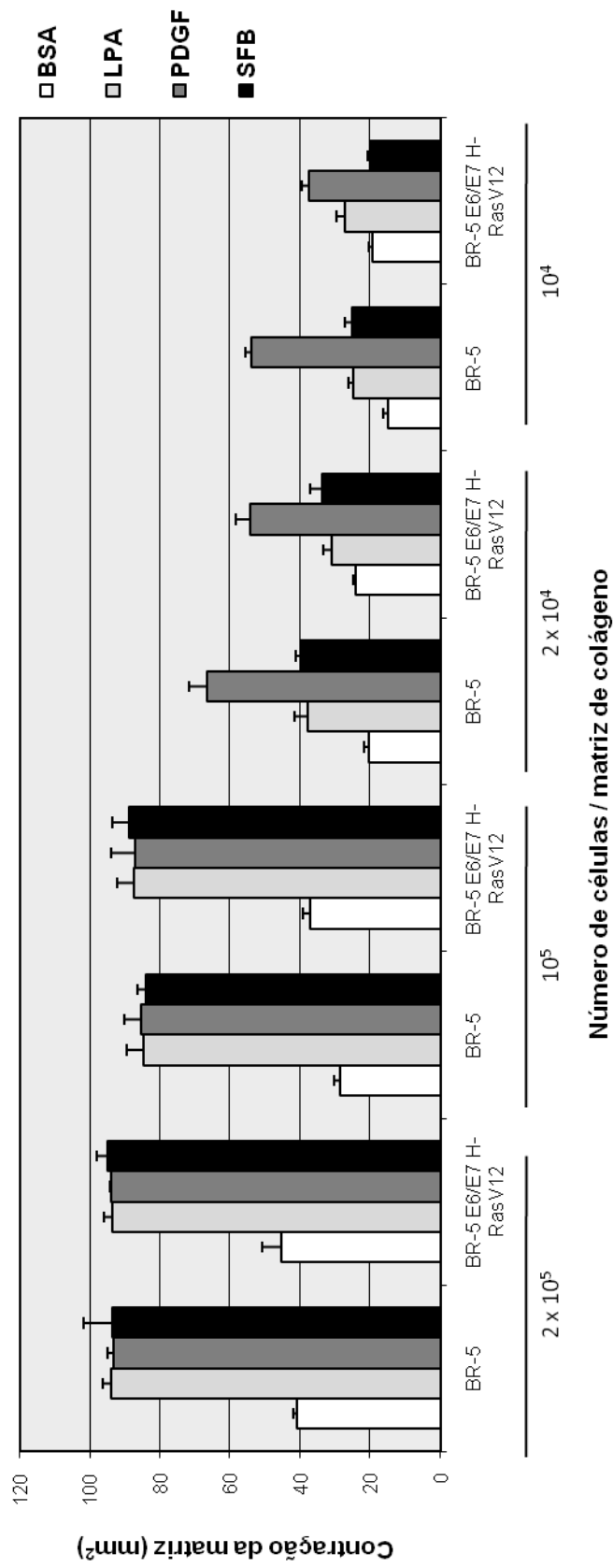


Figura 25. As habilidades de remodelamento das linhagens BR-5 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} são similares, independentemente da densidade celular empregada, no modelo FMC. Fibroblastos das linhagens BR-5 ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I nas concentrações de 2x10⁵, 10⁵, 2x10⁴ e 10⁴ células/matriz para ensaios de *floating matrix contraction* (FMC). Géis flutuantes foram incubados por 4 horas a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (BSA, barras brancas), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e LPA 5nM (LPA, barras cinza claras), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (PDGF, barras cinza escuras), ou DMEM contendo SFB 10% (SFB, barras pretas). Ao fim do período de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, digitalizadas e a extensão da contração de cada gel foi estimada em *software* MetaVue 6.2r6 subtraindo a área de cada gel de 113 mm² (valor equivalente à área original dos géis). Os dados mostrados são médias aritméticas e desvios padrão de um experimento em triplicata e representativo de três ensaios independentes.

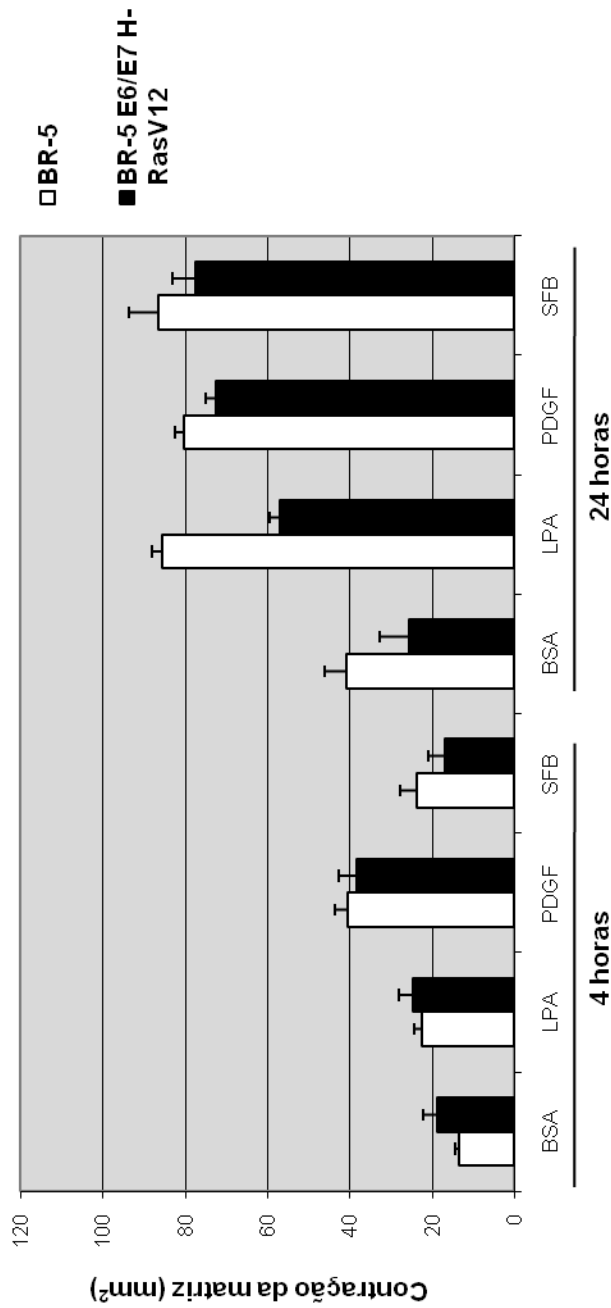


Figura 26. As habilidades de remodelamento das linhagens BR-5 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} são similares no modelo FMC, mesmo quando géis com baixas densidades celulares são cultivados por 24 horas. Fibroblastos das linhagens BR-5 (barras brancas) ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (barras pretas) foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 10⁴ células/matriz para ensaios de *floating matrix contraction* (FMC). Géis flutuantes foram incubados por 4 ou 24 horas a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (BSA), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e LPA 5nM (LPA), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (PDGF), ou DMEM contendo SFB 10% (SFB). Ao fim dos períodos de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, digitalizadas e a extensão da contração de cada gel foi estimada em *software* MetaVue 6.2r6 subtraindo a área de cada gel de 113 mm² (valor equivalente à área original dos géis). Os dados mostrados são médias aritméticas e desvios padrão de um experimento em triplicata e representativo de três ensaios independentes.

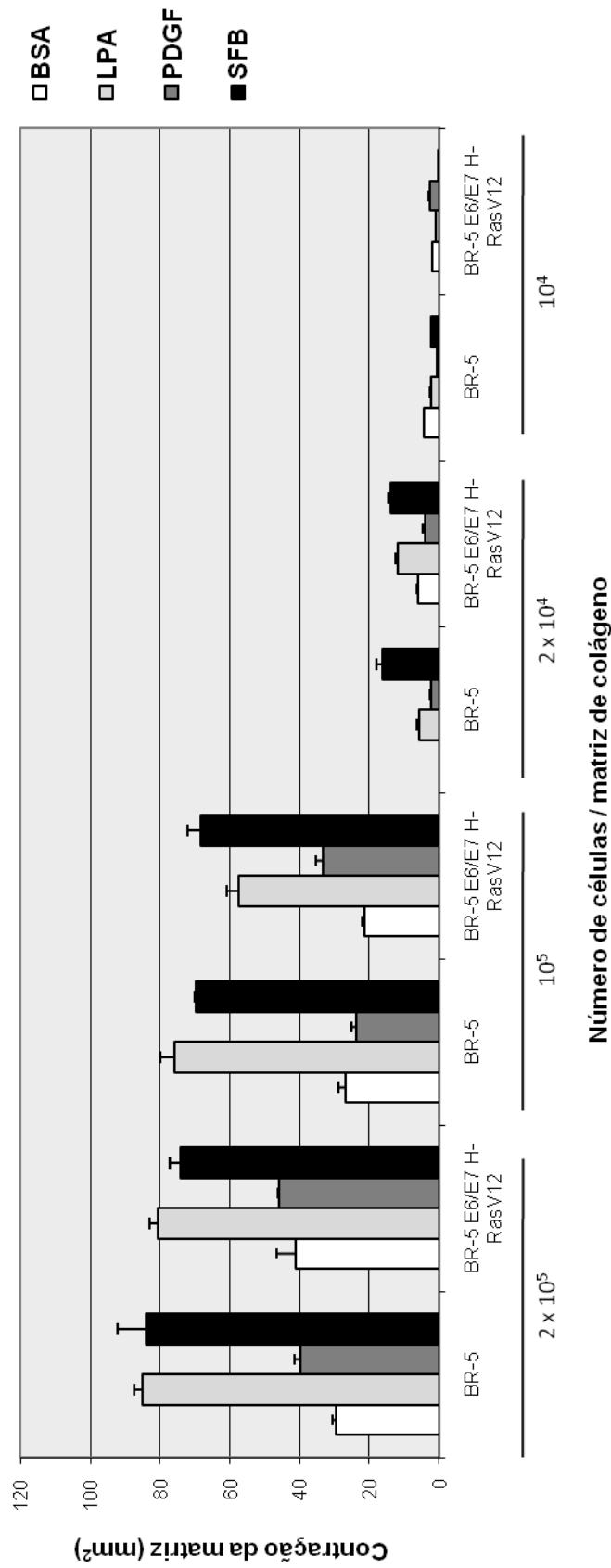


Figura 27. As habilidades de remodelamento das linhagens BR-5 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} são similares, independentemente da densidade celular empregada, no modelo SMC. Fibroblastos das linhagens BR-5 ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I nas concentrações de 2x10⁵, 10⁵, 2x10⁴ e 10⁴ células/matriz para ensaios de *stressed matrix contraction* (SMC). Géis fixados ao substrato foram incubados por 24 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%, lavados com DMEM puro e incubados por mais uma hora a 37°C como géis flutuantes em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (BSA, barras brancas), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e LPA 5nM (LPA, barras cinza claras), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (PDGF, barras cinza escuras), ou DMEM contendo SFB 10% (SFB, barras pretas). Ao fim das incubações as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, digitalizadas e a extensão da contração de cada gel foi estimada em *software* MetaVue 6.2r6 subtraindo a área de cada gel de 13 mm² (valor equivalente à área original dos géis). Os dados mostrados são médias aritméticas e desvios padrão de um experimento em triplicata e representativo de três ensaios independentes.

Número de células semeadas por frasco T75 ($\times 10^6$)	1.0	1.5	3.0
	Número de células coletadas por frasco T75 após 48 horas de cultivo ($\times 10^6$)	2.2 (± 0.3)	2.6 (± 0.3)
BR-5	2.6 (± 0.2)	3.8 (± 0.5)	5.1 (± 0.5)
BR-5 E6/E7	3.0 (± 0.3)	5.4 (± 0.8)	8.5 (± 0.7)
BR-5 E6/E7 H-Ras ^{V12}			

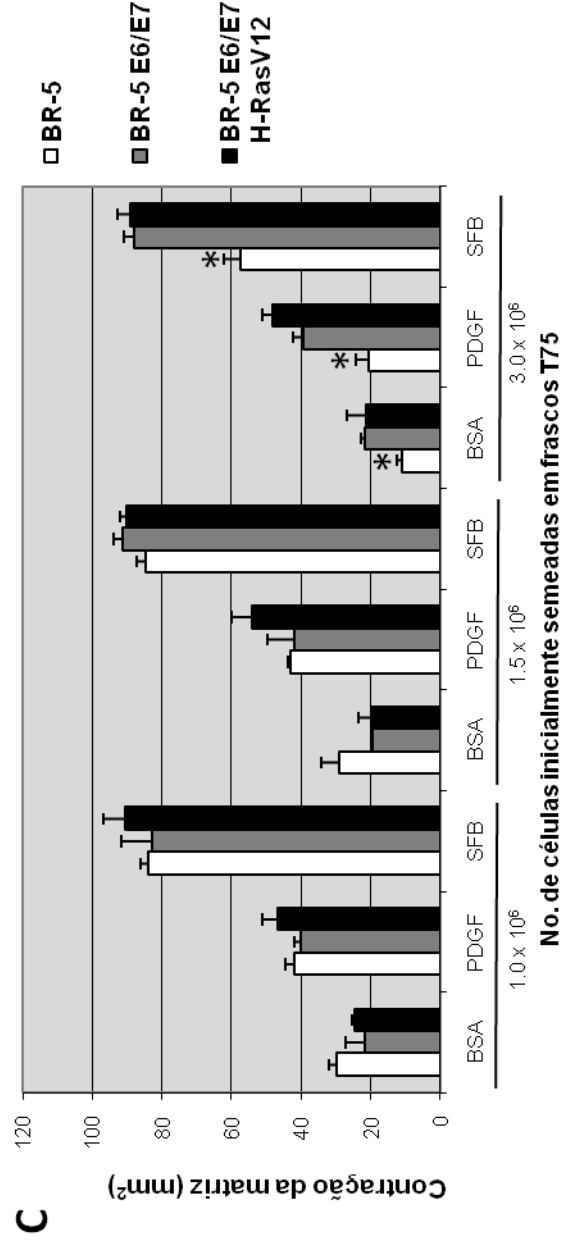
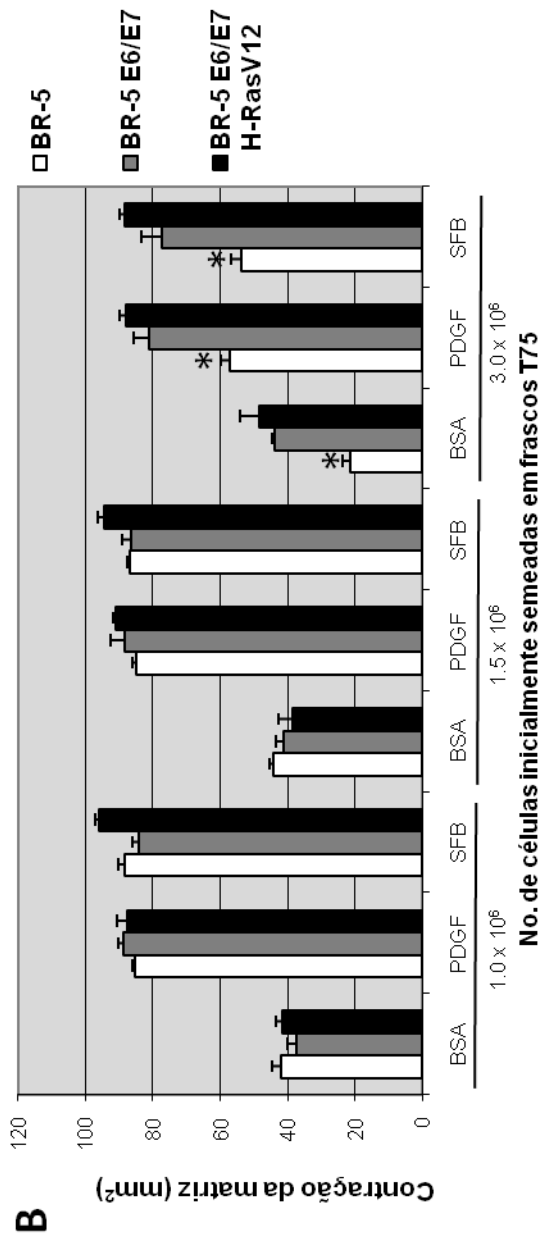


Figura 28. A quiescência de fibroblastos da linhagem BR-5 reduz a habilidade destas células de remodelar géis de colágeno do tipo I. (A) Fibroblastos das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7 ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{VI2} foram coletados e semeados em frascos de cultivo de 75 mm² (T75) nas concentrações iniciais de 1x10⁶, 1,5x10⁶ ou 3x10⁶, e incubados por 48 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as culturas foram triplicadas e o número de células por frasco foi estimado por contagem em câmara de Neubauer. As células foram, posteriormente, utilizadas em ensaios de remodelamento de géis de colágeno do tipo I na concentração de 2x10⁵ células/matriz. Para ensaios de *floating matrix contraction* (B), géis flutuantes foram incubados por 4 horas a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (BSA), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e LPA 5nM (LPA), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (PDGF), ou DMEM contendo SFB 10% (SFB). Para ensaios de *stressed matrix contraction* (C), géis fixados ao substrato foram incubados por 24 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%, lavados com DMEM puro e incubados por mais uma hora a 37°C como géis flutuantes nas mesmas condições empregadas no ensaio de FMC. Ao fim das incubações as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, digitalizadas e a extensão da contração de cada gel foi estimada em *software* MetaVue 6.2r6 subtraindo a área de cada gel de 113 mm² (valor equivalente à área original dos géis). Os dados mostrados são médias aritméticas e desvios padrão de experimentos em triplicata e representativos de três ensaios independentes. * Amostras com inibição significativa da habilidade de remodelamento de géis de colágeno do tipo I.

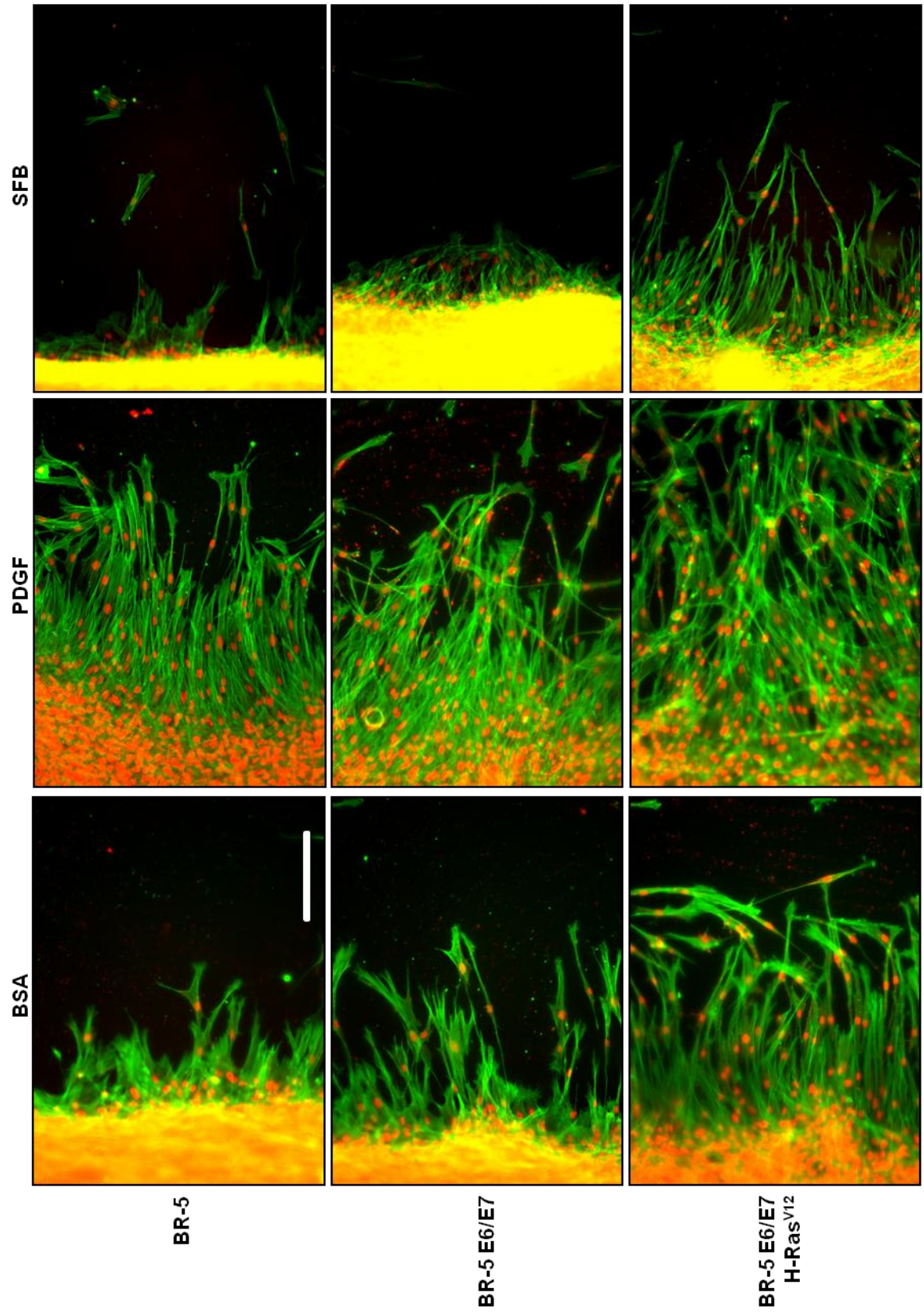


Figura 29. Fibroblastos da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} apresentam fenótipo migratório superior em substrato 2D de colágeno do tipo I quando comparados a fibroblastos das linhagens BR-5 e BR-5 E6/E7, independentemente do agonista empregado. Fibroblastos das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7 ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} foram coletados e semeados em laminulas de vidro pré-incubadas em solução contendo 50 µg de colágeno do tipo I na concentração de 5x10⁵ células/laminula. As placas contendo as laminulas foram incubadas *overnight* a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as camadas de células foram lesionadas com o auxílio de um *tip* plástico (*scrape wounded*), lavadas com DMEM puro por duas vezes, e incubadas por 16 horas a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA, DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF, ou DMEM contendo SFB 10%. Ao fim do período de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, incubadas com faloídina-alexa 488 1:150 (verde), iodo de propídeo 8 µg/mL (vermelho) e RNase DNase-free 20 µg/mL, e montadas entre lâmina e laminula com o auxílio de Fluoromount G. As imagens foram captadas por *software* de aquisição MetaVue 6.2r6 com auxílio de uma câmera COOL Snap ES acoplada a microscópio Nikon Eclipse E600. Os dados mostrados são representativos de três ensaios independentes. Barra: 100 µm.

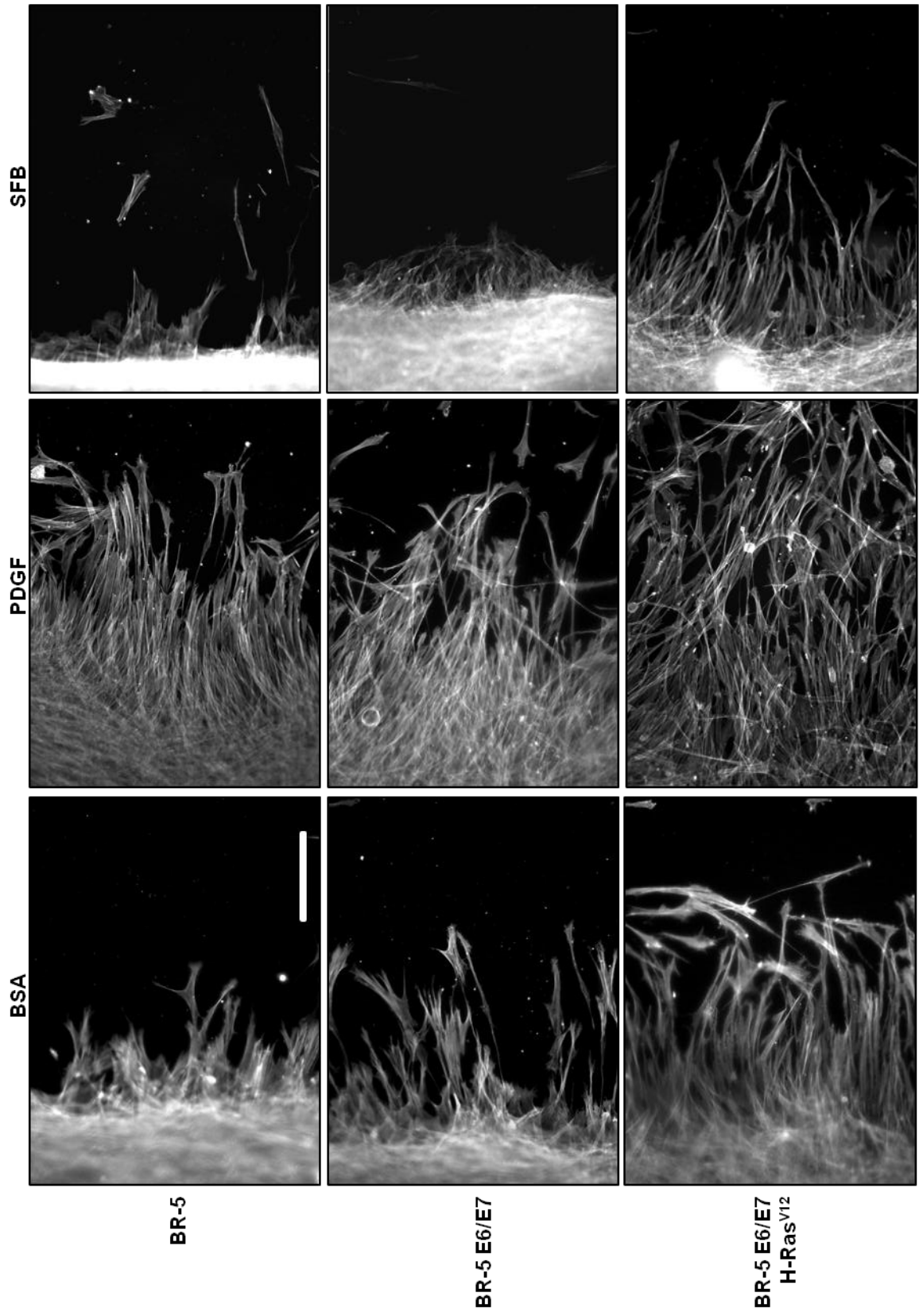


Figura 30. Fibroblastos da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{VI2} apresentam fenótipo migratório superior em substrato 2D de colágeno do tipo I quando comparados a fibroblastos das linhagens BR-5 e BR-5 E6/E7, independentemente do agonista empregado. Decomposição das imagens da figura 20, mostrando apenas a marcação com faloidina-alexa 488 (para citosqueleto de actina). Barra: 100 μ m.

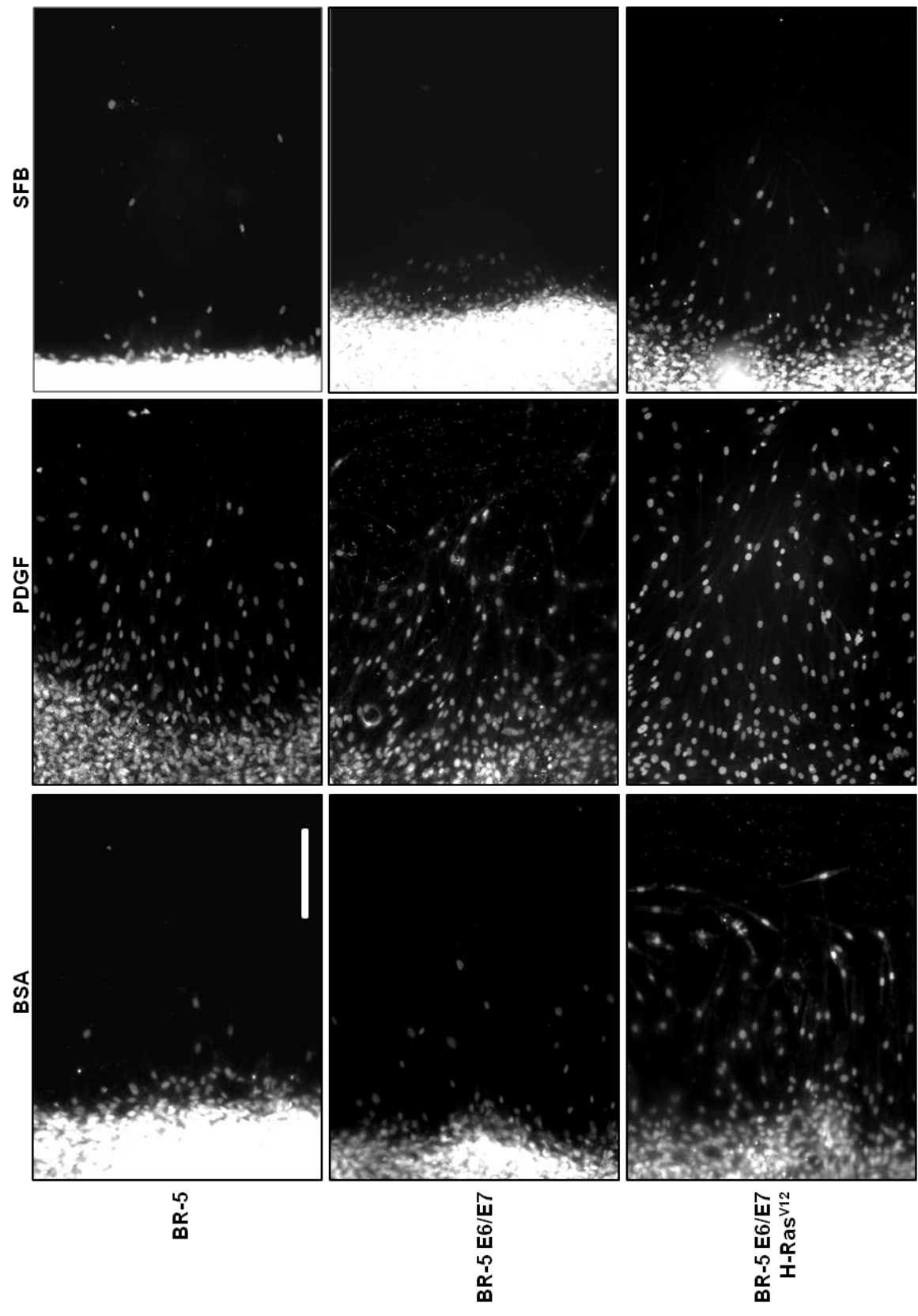


Figura 31. Fibroblastos da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} apresentam fenótipo migratório superior em substrato 2D de colágeno do tipo I quando comparados a fibroblastos das linhagens BR-5 e BR-5 E6/E7, independentemente do agonista empregado. Decomposição das imagens da figura 20, mostrando apenas a marcação com iodeto de propídeo (para DNA). Barra: 100 μm .

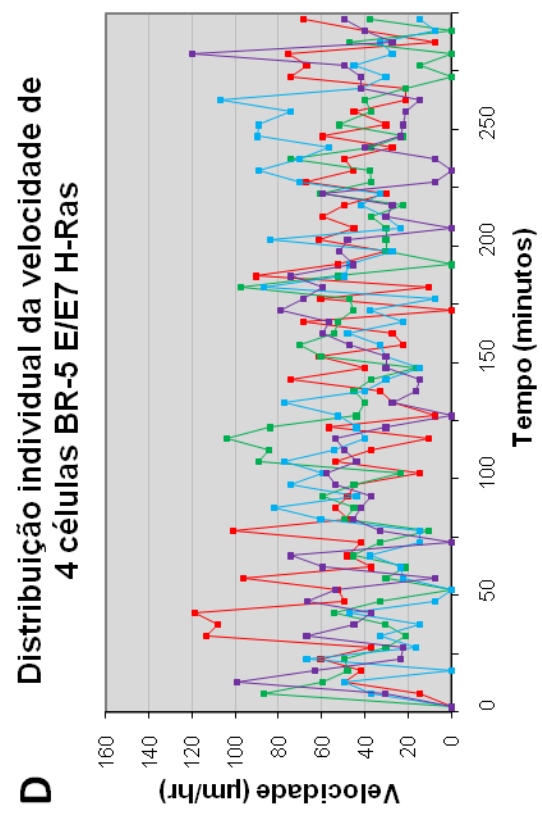
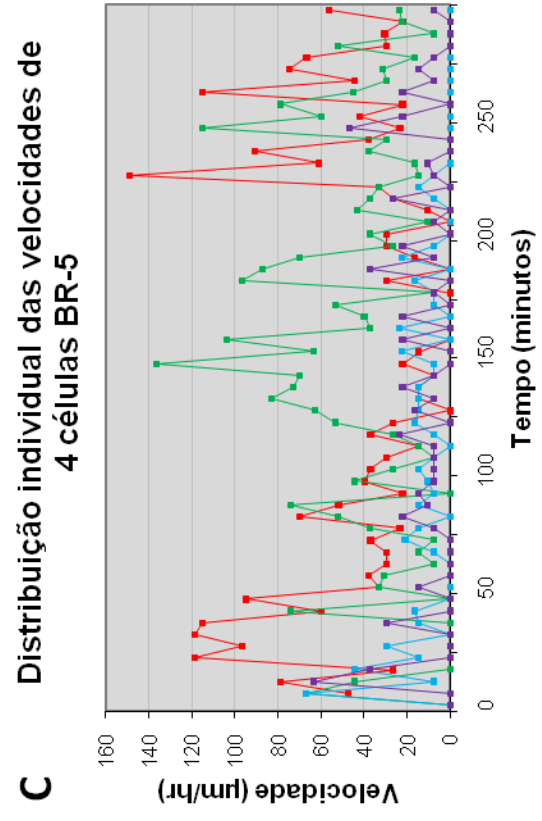
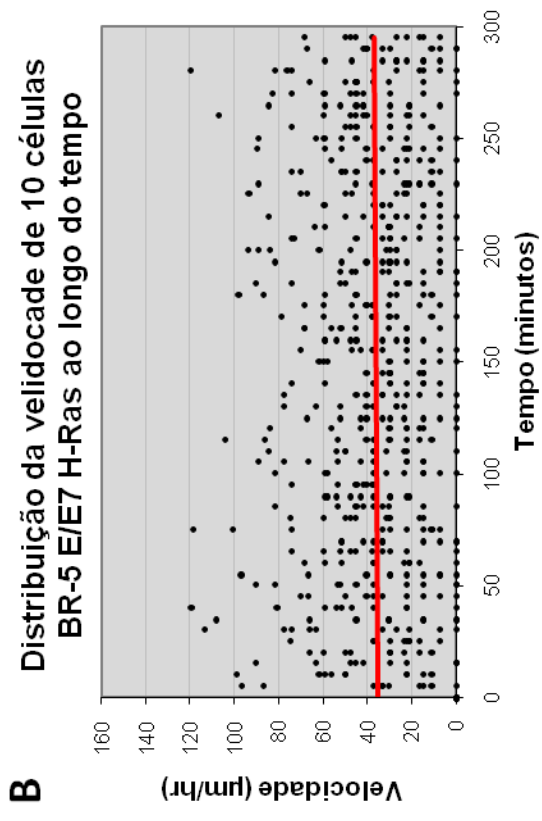
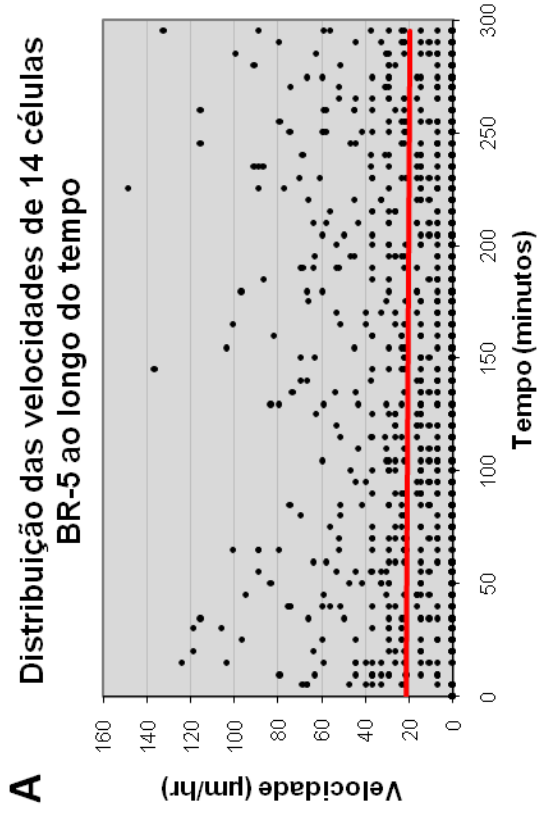


Figura 32. Fibroblastos da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} apresentam maior taxa de migração em substrato 2D de colágeno do tipo I quando comparados a fibroblastos das linhagens BR-5, quando tratados com PDGF. Fibroblastos das linhagens BR-5 ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} foram coletados e semeados em laminulas de vidro pré-incubadas em solução contendo 50 µg de colágeno do tipo I na concentração de 10⁴ células/laminula. As placas contendo as laminulas foram incubadas por 6 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as amostras foram lavadas em DMEM e incubadas por 5 horas a 37°C em meio CO₂-independente contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF. Esta incubação ocorreu em câmara ambiental acoplada a um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M equipado com câmera digital Nikon DXM1200F. As amostras foram fotografadas em intervalos de 5 minutos e vídeos foram compilados a partir de fotos de cada ponto de tempo, utilizando o programa Metamorph 7.1.1.0. A velocidade de translocamento só foi mensurada em células individualizadas, que não sofreram mitose nem saíram do campo fotografado ao longo de todo o período de incubação. Ao todo, as velocidades de 60 células de cada linhagem, distribuídas em 8 campos de amostras em duplicata, foram mensuradas com o auxílio do *plugin* “Manual Tracking” do programa ImageJ 1.38X. As figuras A e B são amostragens de 14 células BR-5 e 10 células BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} respectivamente. Cada ponto representa a velocidade de uma célula em um período de 5 minutos. A regressão linear da velocidade média (linha vermelha) também é exibida. As figuras C e D são amostragens da variação de velocidade de 4 células BR-5 e 4 células BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12}, respectivamente. Os experimentos são representativos de dois ensaios independentes.

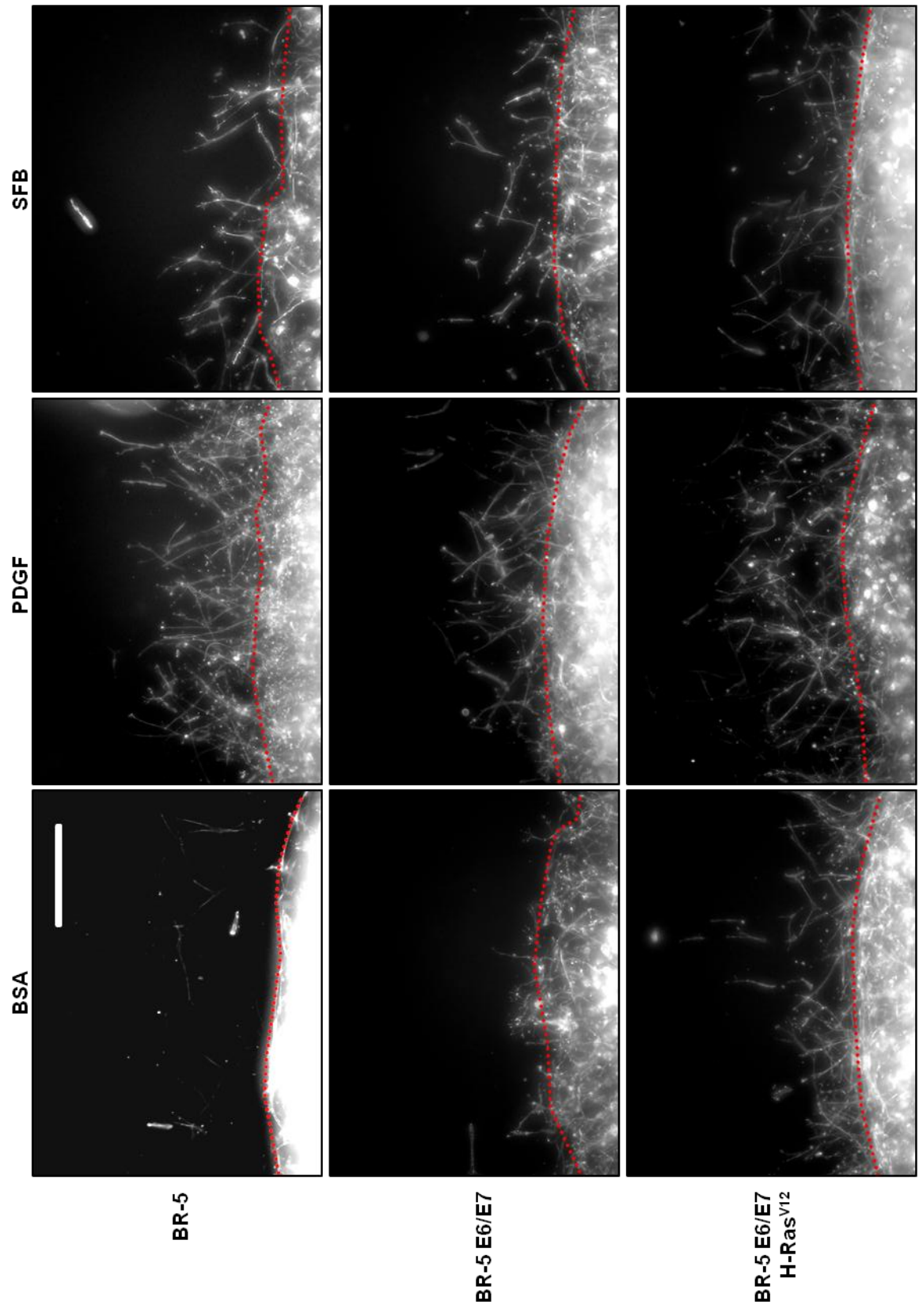


Figura 33. A taxa de migração em matrizes aninhadas é dependente do agonista empregado, mas é sempre superior em fibroblastos da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12}. Fibroblastos das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7, ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz como em ensaios de *floating matrix contraction*. Os géis flutuantes foram incubados por 6 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as amostras contraídas foram lavadas em DMEM, aninhadas em matrizes de colágeno sem células, e incubadas por 16 horas a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (BSA), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (PDGF), ou DMEM contendo SFB 10% (SFB). Ao fim do período de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, incubadas com faloidina-alexa 488 1:150, iodeto de propídeo 8 µg/mL e RNase DNase-free 20 µg/mL, e montadas entre lâmina e lamínula com o auxílio de Fluoromount G. As imagens foram captadas por *software* de aquisição MetaVue 6.216 com auxílio de uma câmara COOL Snap ES acoplada a microscópio Nikon Eclipse E600. As imagens mostram apenas o padrão de marcação com faloidina-alexa 488 e são representativas de pelo menos três ensaios independentes. A linha pontilhada vermelha demarca o limite entre as matrizes aninhada e externa. Barra: 200 µm.

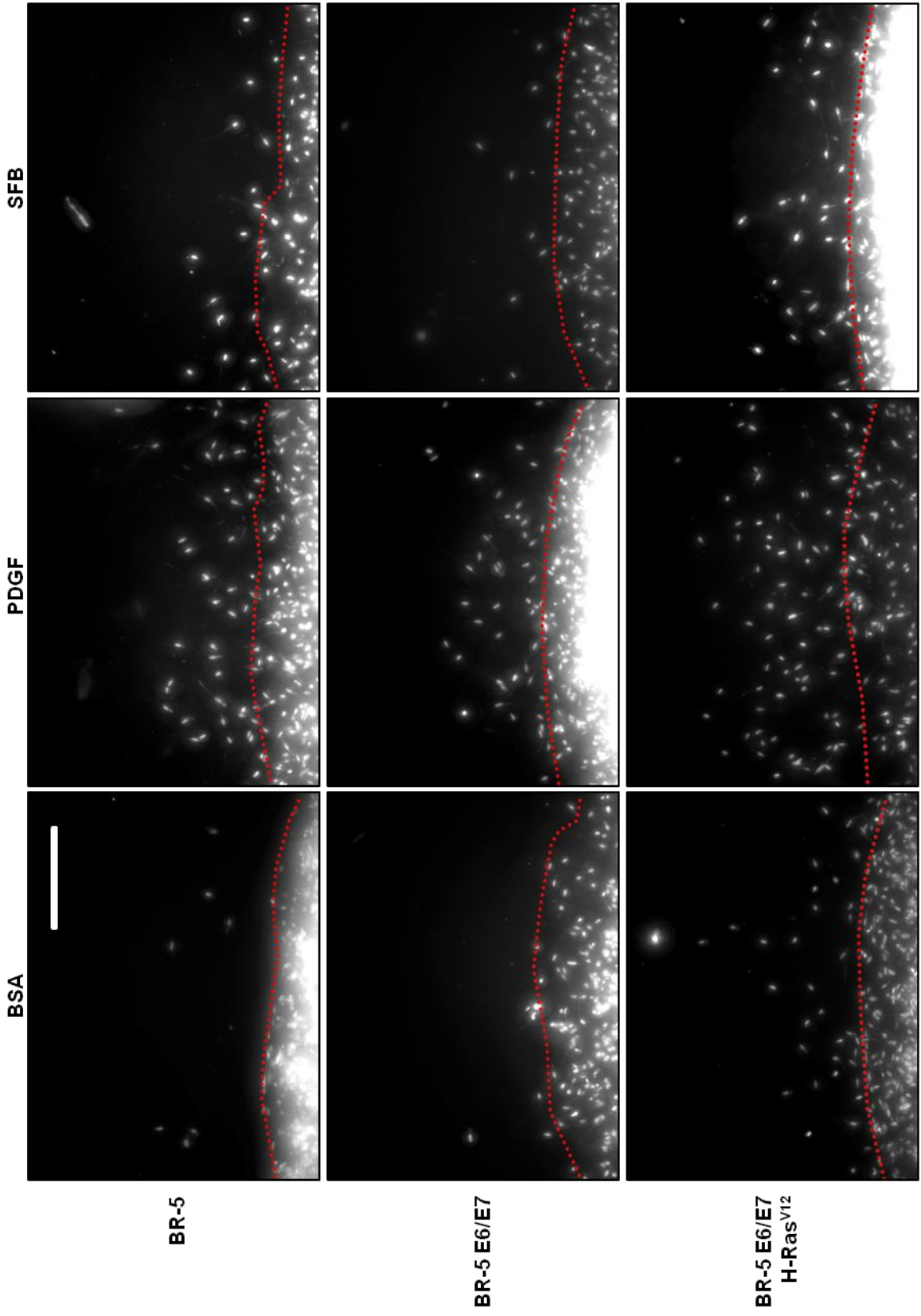


Figura 34. A taxa de migração em matrizes aninhadas é dependente do agonista empregado, mas é sempre superior em fibroblastos da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12}. Idem a figura 34 salvo que as imagens mostram apenas o padrão de marcação com iodeto de propídeo. Barra: 200 µm.

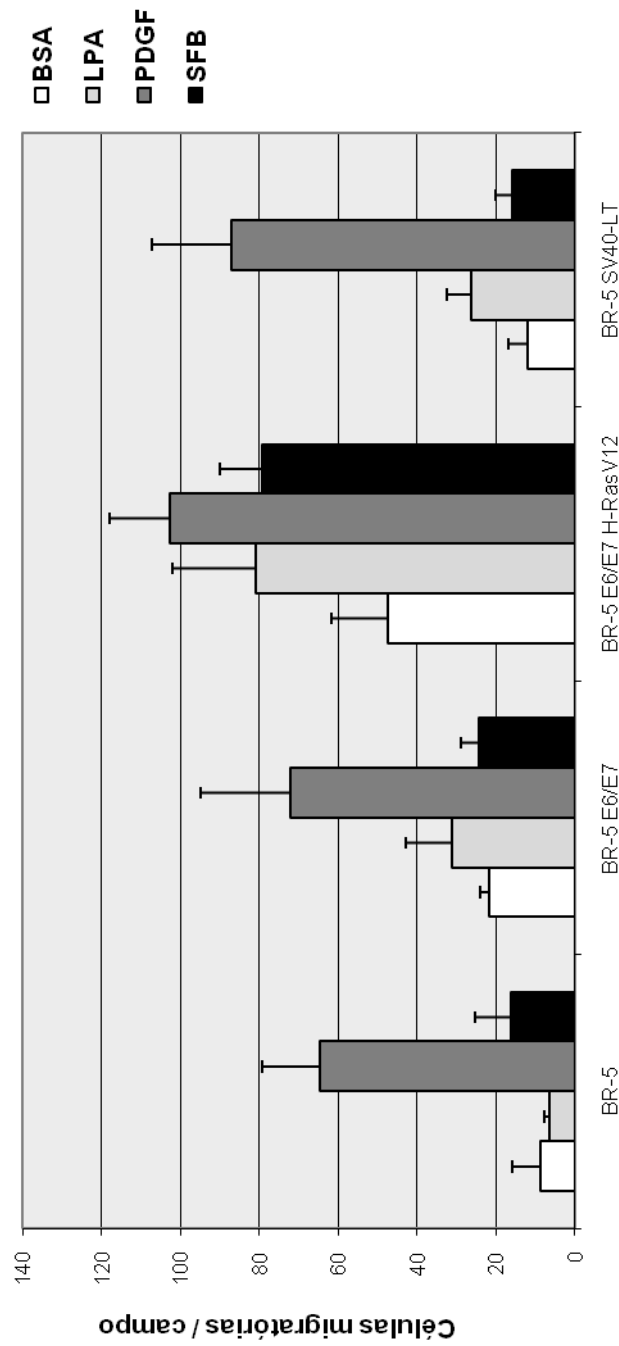


Figura 35. A taxa de migração em matrizes aninhadas é dependente do agonista empregado, mas é sempre superior em fibroblastos da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12}. Fibroblastos das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7, BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} ou BR-5 SV40-LT foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz como em ensaios de *floating matrix contraction*. Os géis flutuantes foram incubados por 6 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as amostras contraídas foram lavadas em DMEM, aninhadas em matrizes de colágeno sem células, e incubadas por 24 horas a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (barras brancas), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e LPA 5nM (barras cinza claras), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (barras cinza escuras), ou DMEM contendo SFB 10% (barras pretas). Ao fim do período de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7%, incubadas com iodoeto de propídeo 8 µg/ml e RNase DNase-free 20 µg/ml, e montadas entre lâmina e lamínula com o auxílio de Fluoromount G. O número de células migratórias foi estimado em microscópio Nikon Eclipse E600 pela contagem do número de núcleos fora da matriz aninhada em 15 campos microscópicos aleatórios para cada categoria amostral. Os dados mostrados são médias aritméticas e desvios padrão de experimentos em triplicata e representativos de três ensaios independentes.

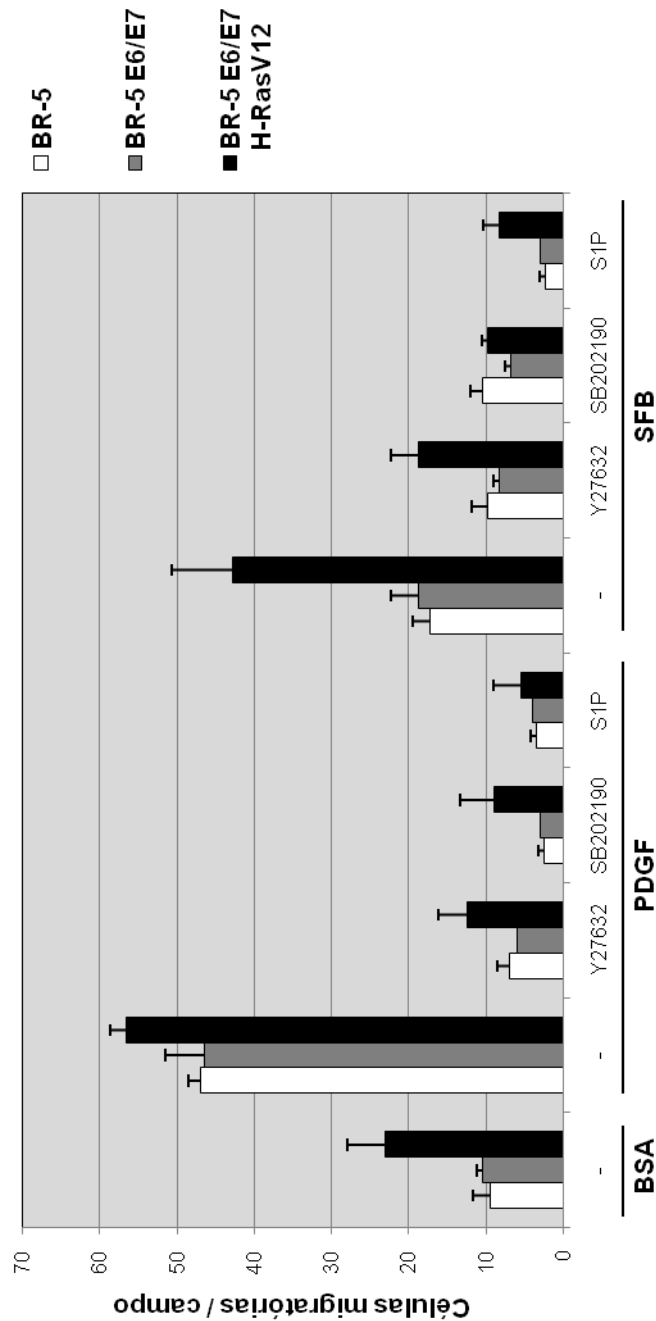


Figura 36. A taxa de migração em matrizes aninhadas é dependente do agonista empregado, mas é sempre superior em fibroblastos da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12}. Fibroblastos das linhagens BR-5 (barras brancas), BR-5 E6/E7 (barras cinza), ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (barras pretas) foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz como em ensaios de *floating matrix contraction*. Os géis flutuantes foram incubados por 6 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as amostras contraídas foram lavadas em DMEM, aninhadas em matrizes de colágeno sem células, e incubadas por 16 horas a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (BSA); DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (PDGF); ou DMEM contendo SFB 10% (SFB). Complementarmente, os meios foram suplementados com SB202190 50 μM , Y27632 10 μM , ou S1P 1 μM , conforme indicado na figura. Ao fim do período de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7%, incubadas com iodo de propídeo 8 $\mu\text{g/ml}$ e RNase DNase-free 20 $\mu\text{g/ml}$, e montadas entre lâmina e laminula com o auxílio de Fluoromount G. O número de células migratórias foi estimado em microscópio Nikon Eclipse E600 pela contagem do número de núcleos fora da matriz aninhada em 15 campos microscópicos aleatórios para cada categoria amostral. Os dados mostrados são médias aritméticas e desvios padrão de experimentos em triplicata e representativos de dois ensaios independentes.

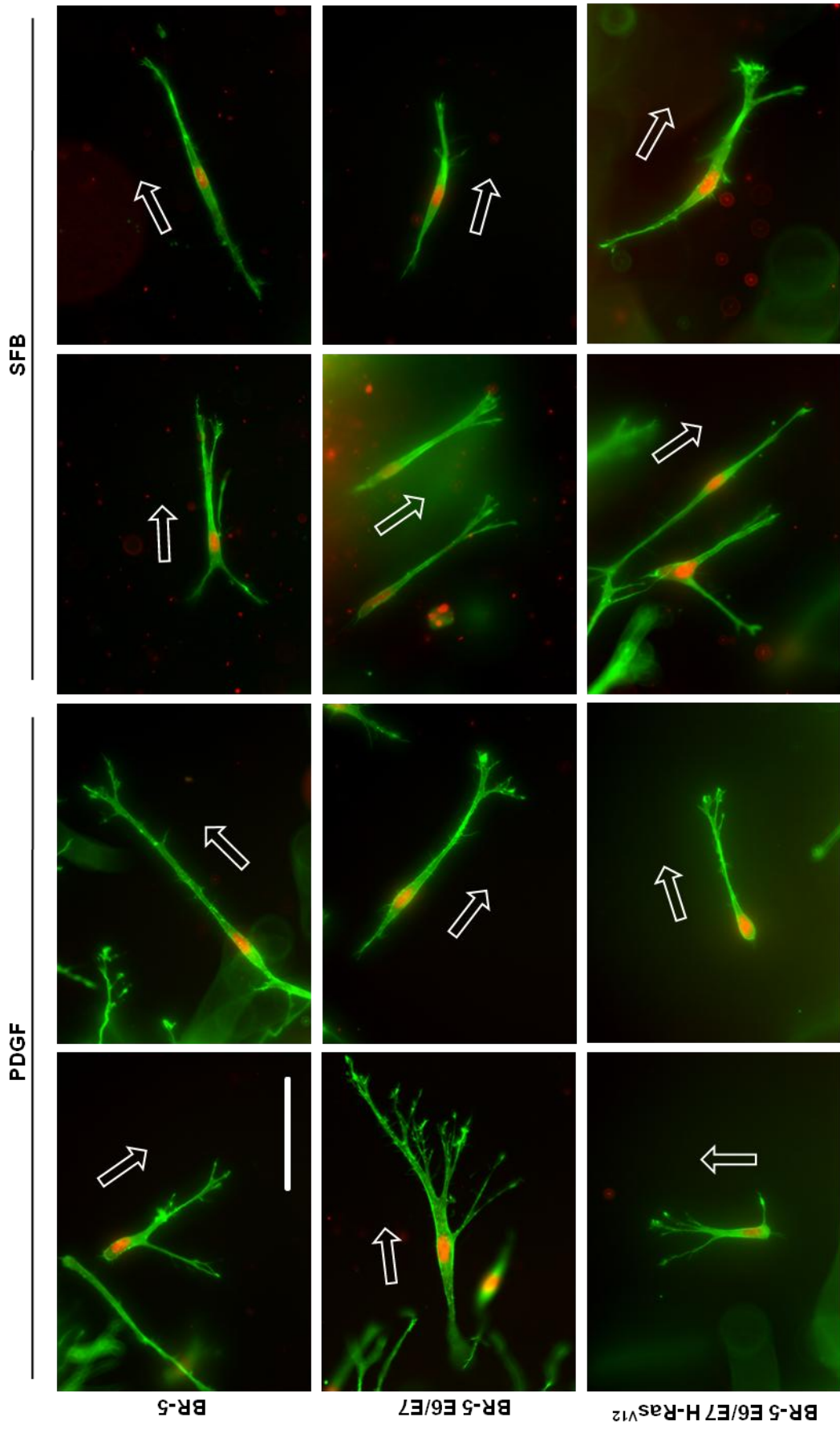


Figura 37. Fibroblastos da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12}, mas não da linhagem BR-5, são capazes de migrar em géis de colágeno do tipo I mesmo após 48 horas de remodelamento da matriz aninhada. Fibroblastos das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7, ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz como em ensaios de *floating matrix contraction*. Os géis flutuantes foram incubados por 6 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as amostras contraídas foram lavadas em DMEM, aninhadas em matrizes de colágeno sem células, e incubadas por 16 horas a 37°C em DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF. Ao fim do período de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7 %, incubadas com faloidina-alexa 488 1:150 (verde), iodeto de propídeo 8 µg/mL (vermelho) e RNase DNase-free 20 µg/mL, e montadas entre lâmina e laminula com o auxílio de Fluoromount G. As imagens foram captadas por *software* de aquisição MetaVue 6.2r6 com auxílio de uma câmera COOL Snap ES acoplada a microscópio Nikon Eclipse E600. Os dados mostrados são representativos de pelo menos três ensaios independentes. As setas indicam a direção do movimento. Barra: 25 µm.

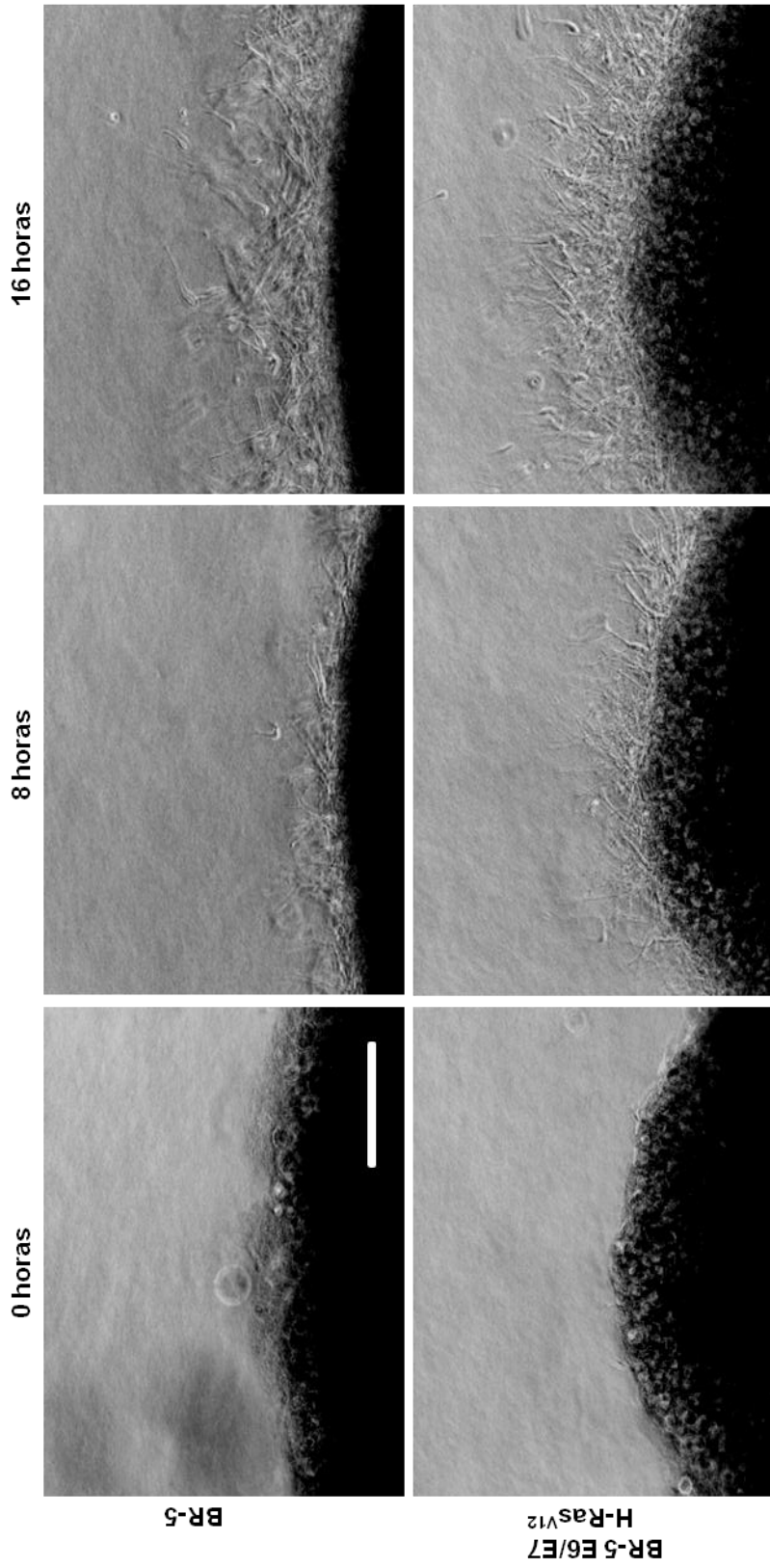


Figura 38. A migração em géis de colágeno do tipo I induzida por PDGF é semelhante entre fibroblastos das linhagens BR-5 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12}. Fibroblastos das linhagens BR-5 (barras brancas) ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (barras pretas) foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz como em ensaios de *floating matrix contraction*. Os géis flutuantes foram incubados por 6, 24 ou 48 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as amostras contraídas foram lavadas em DMEM, aninhadas em matrizes de colágeno sem células, e incubadas por 16 horas a 37°C em meio CO₂-independente contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF. Esta incubação ocorreu em câmara ambiental acoplada a um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M equipado câmara digital Nikon DXM1200F. As amostras foram fotografadas em intervalos de 10 minutos utilizando o *software* de aquisição Metamorph 7.1.1.0. Os figuras mostradas são seqüências temporais de uma mesma amostra (ver vídeos 1 e 2) representativa de quatro ensaios independentes. Barra: 200 µm.

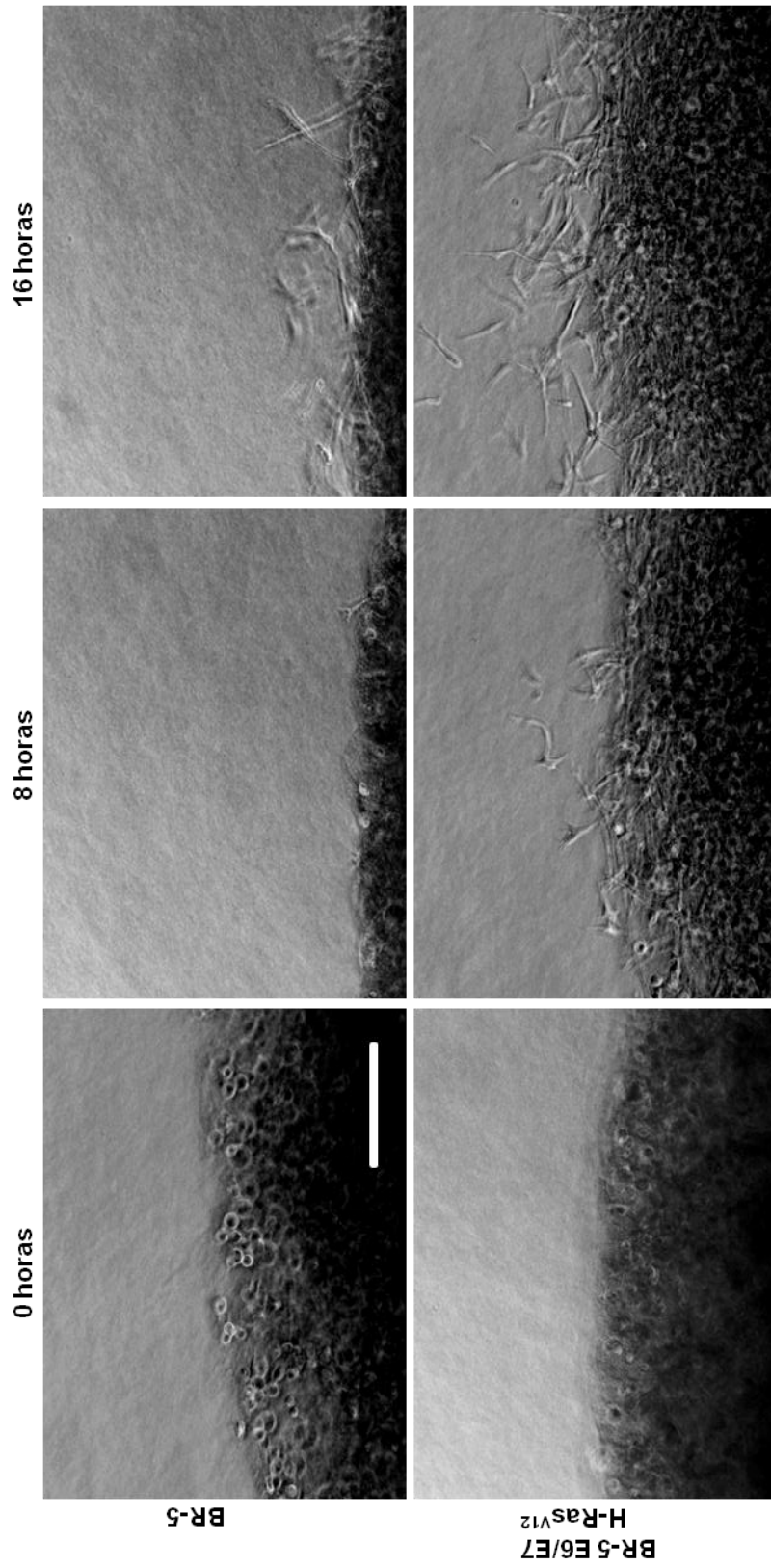


Figura 39. A migração em géis de colágeno do tipo I induzida por SFB é maior em fibroblastos da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} do que fibroblastos da linhagem BR-5. Fibroblastos das linhagens BR-5 (barras brancas) ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (barras pretas) foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz como em ensaios de *floating matrix contraction*. Os géis flutuantes foram incubados por 6, 24 ou 48 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as amostras contraídas foram lavadas em DMEM, aninhadas em matrizes de colágeno sem células, e incubadas por 16 horas a 37°C em meio CO₂-independente contendo 5 mg/ml de BSA e SFB 10%. Esta incubação ocorreu em câmara ambiental acoplada a um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M equipado câmera digital Nikon DXMI200F. As amostras foram fotografadas em intervalos de 10 minutos utilizando o *software* de aquisição Metamorph 7.1.1.0. Os figuras mostradas são sequências temporais de uma mesma amostra (ver vídeos 3 e 4) representativa de quatro ensaios independentes. Barra: 100 µm.

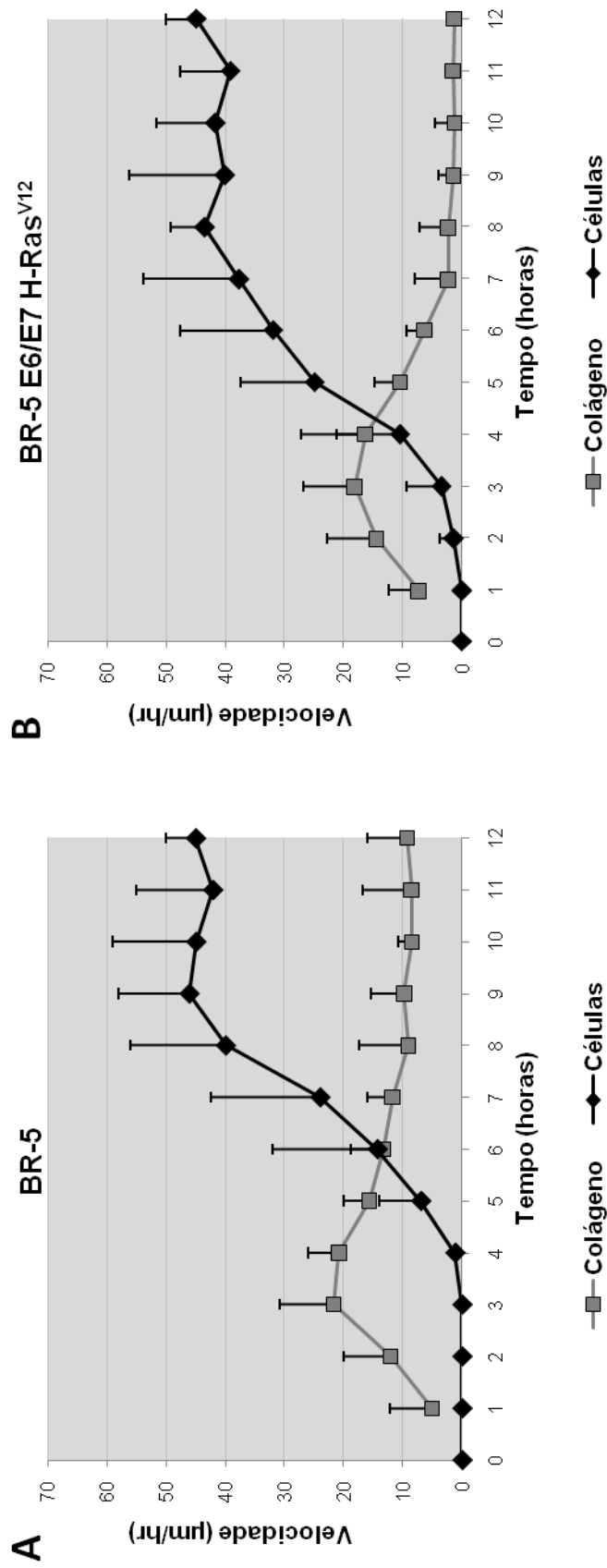


Figura 40. O padrão dos translocamentos das células e da matriz externa de colágeno do tipo I, induzidos por PDGF, é semelhante entre fibroblastos das linhagens BR-5 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12}. Fibroblastos das linhagens BR-5 (A) ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (B) foram coletados e sementeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz como em ensaios de *floating matrix contraction*. Os géis flutuantes foram incubados por 6 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as amostras contraídas foram lavadas em DMEM, aninhadas em matrizes de colágeno sem células, e incubadas por 12 horas a 37°C em meio CO₂-independente contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF. Esta incubação ocorreu em câmara ambiental acoplada a um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M equipado com câmera digital Nikon DXMI200F. As amostras foram fotografadas em intervalos de 10 minutos e vídeos foram compilados a partir de fotos de cada ponto de tempo, utilizando o programa Metamorph 7.1.1.0. Em cada vídeo a velocidade de translocamento de pelo menos 5 células individuais e de pelo menos 5 pontos fixos na malha de colágeno foram medidos com o auxílio do *plugin "Manual Tracking"* do programa ImageJ 1.38X. A velocidade do colágeno foi corrigida em relação ao movimento da interface entre as matrizes aninhada e externa. Cada ponto representa a média e desvio padrão de pelo menos 15 fibroblastos/pontos da matriz externa distintos. Os experimentos foram realizados em triplicata e são representativos de dois ensaios independentes.

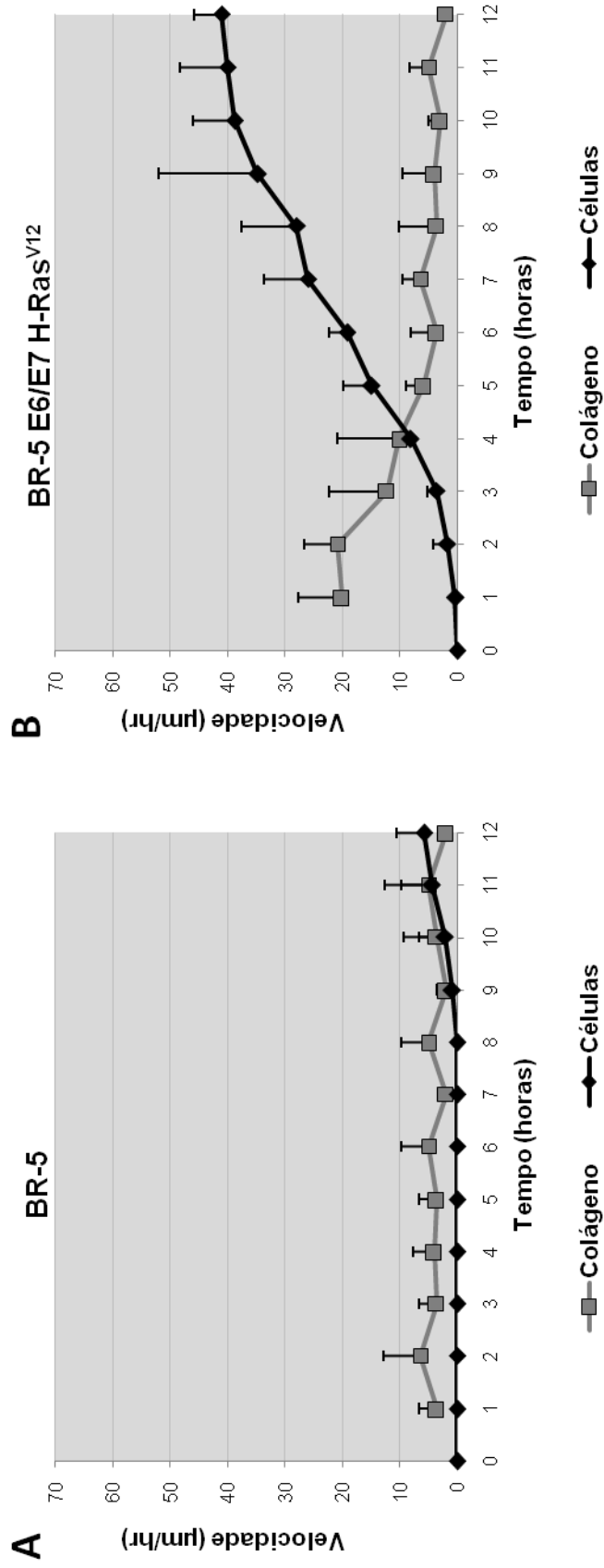


Figura 41. O padrão dos translocamentos das células e da matriz externa de colágeno do tipo I, induzidos por SFB, é distinto entre fibroblastos das linhagens BR-5 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12}. Fibroblastos das linhagens BR-5 (A) ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (B) foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz como em ensaios de *floating matrix contraction*. Os géis flutuantes foram incubados por 6 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as amostras contraídas foram lavadas em DMEM, aninhadas em matrizes de colágeno sem células, e incubadas por 12 horas a 37°C em meio CO₂-independente contendo 5 mg/ml de BSA e SFB 10%. Esta incubação ocorreu em câmara ambiental acoplada a um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M equipado com câmera digital Nikon DXM1200F. As amostras foram fotografadas em intervalos de 10 minutos e vídeos foram compilados a partir de fotos de cada ponto de tempo, utilizando o programa Metamorph 7.1.1.0. Em cada vídeo a velocidade de translocamento de pelo menos 5 células individuais e de pelo menos 5 pontos fixos na malha de colágeno foram medidos com o auxílio do *plugin "Manual Tracking"* do programa ImageJ 1.38X. A velocidade do colágeno foi corrigida em relação ao movimento da interface entre as matrizes aninhada e externa. Cada ponto representa a média e desvio padrão de pelo menos 15 fibroblastos/pontos da matriz externa distintos. Os experimentos foram realizados em triplicata e são representativos de dois ensaios independentes.

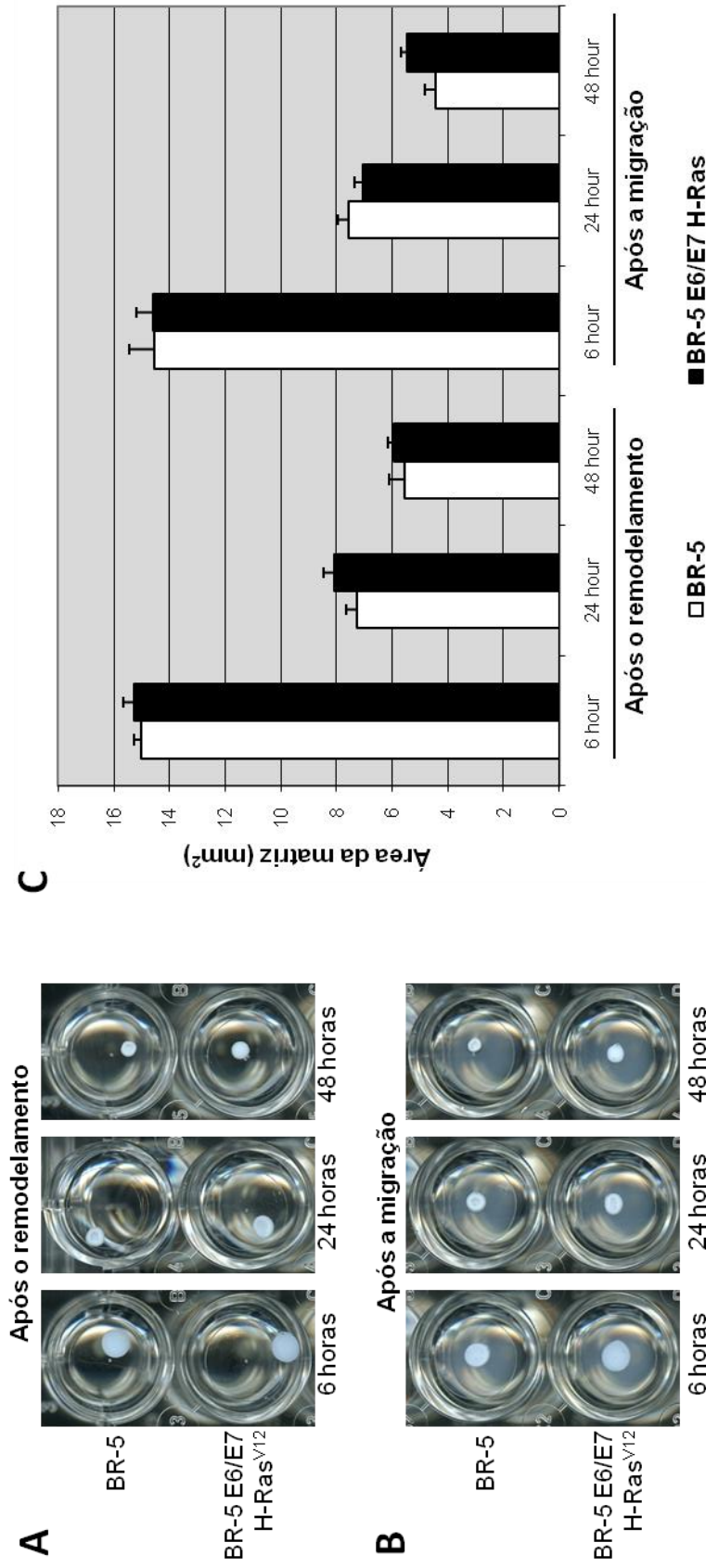


Figura 42. Fibroblastos da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12}, mas não da linhagem BR-5, são capazes de migrar em géis de colágeno do tipo I mesmo após 48 horas de remodelamento da matriz aninhada. Fibroblastos das linhagens BR-5 (barras brancas) ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (barras pretas) foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz como em ensaios de *floating matrix contraction*. (A) Os géis flutuantes foram incubados por 6, 24 ou 48 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Ao final de cada período de incubação a imagem das amostras foram digitalizadas. (B) As amostras contraídas por 6, 24 ou 48 horas foram lavadas em DMEM, aninhadas em matrizes de colágeno sem células, e incubadas por 16 horas a 37°C em DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF. Ao fim das incubações as amostras foram fixadas com formaldeído 3,7 %, e suas imagens digitalizadas. (C) A área de cada gel foi estimada em *software* MetaVue 6.2tr6. Os dados mostrados são médias aritméticas e desvios padrão de experimentos em triplicata e representativos de dois ensaios independentes.

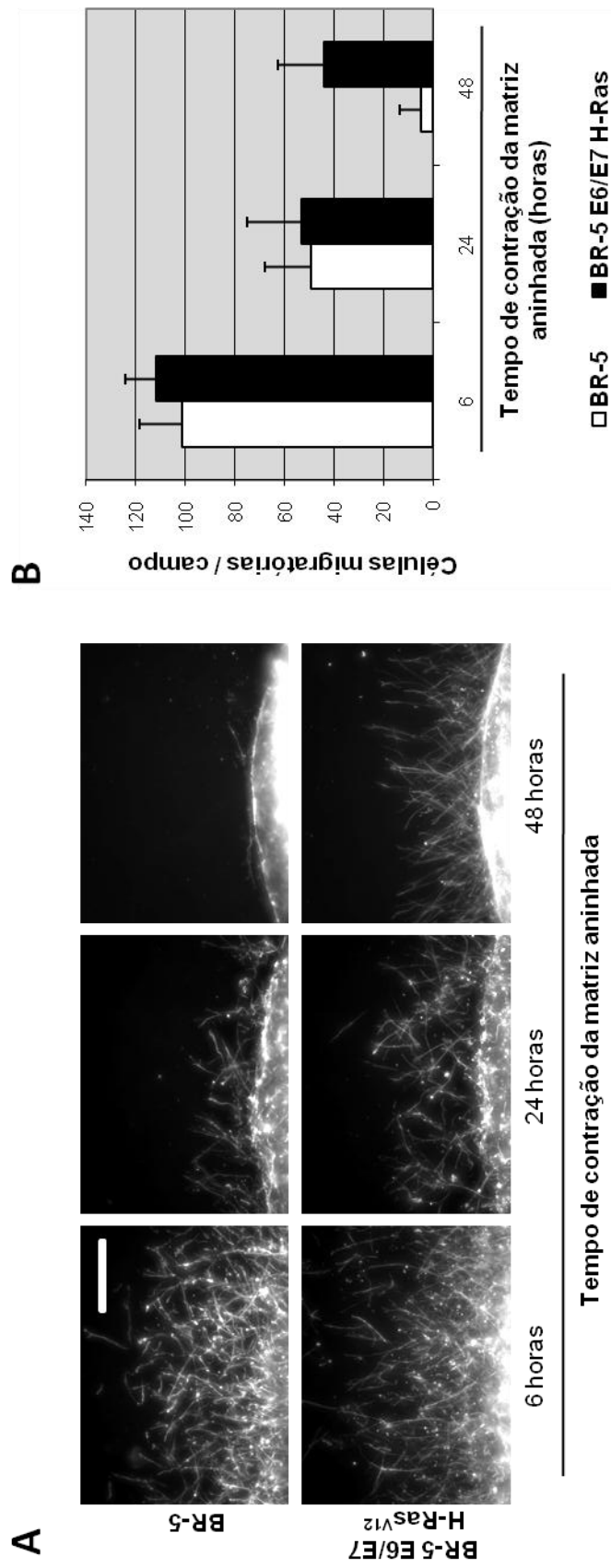


Figura 43. **Fibroblastos da linhagem BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12}, mas não da linhagem BR-5, são capazes de migrar em géis de colágeno do tipo I mesmo após 48 horas de remodelamento da matriz aninhada.** Fibroblastos das linhagens BR-5 (barras brancas) ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (barras pretas) foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz como em ensaios de *floating matrix contraction*. Os géis flutuantes foram incubados por 6, 24 ou 48 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as amostras contraídas foram lavadas em DMEM, aninhadas em matrizes de colágeno sem células, e incubadas por 24 horas a 37°C em DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF. Ao fim do período de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7% e incubadas com faloídina-alexa 488, iodeto de propídeo 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e RNase DNase-free 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em seguida foram montadas entre lâmina e laminula com o auxílio de Fluoromount G. (A) Fluorescência de microfilamentos. As imagens em foram captadas por *software* de aquisição MetaVue 6.2r6 com auxílio de uma câmera COOL Snap ES acoplada a microscópio Nikon Eclipse E600. Barra: 200 μm . (B) O número de células migratórias foi estimado pela contagem do número de núcleos fora da matriz aninhada em 15 campos microscópicos aleatórios para cada categoria amostral. Os dados mostrados em são médias aritméticas e desvios padrão de experimentos em triplicata e representativos de três ensaios independentes.

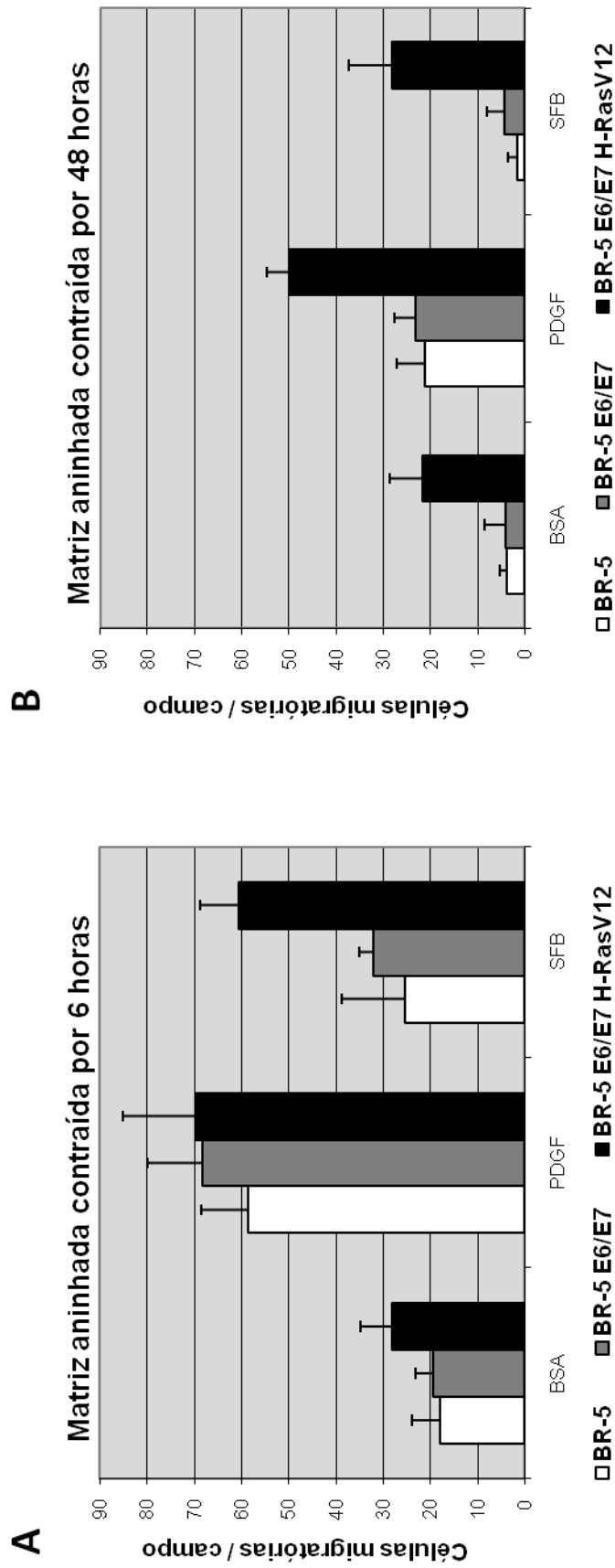


Figura 44. **A taxa de migração em matrizes aninhadas é dependente do agonista empregado e do tempo de remodelamento que precede a migração.** Fibroblastos das linhagens BR-5 (barras brancas), BR-5 E6/E7 (barras cinza) ou BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (barras pretas) foram coletados e semeados em géis de colágeno do tipo I na concentração de 2×10^5 células/matriz como em ensaios de *floating matrix contraction*. Os géis flutuantes foram incubados por (A) 6 ou (B) 48 horas a 37°C em DMEM contendo SFB 10%. Em seguida as amostras contraídas foram lavadas em DMEM, aninhadas em matrizes de colágeno sem células, e incubadas por 16 horas a 37°C em: DMEM contendo 5 mg/ml de BSA (BSA), DMEM contendo 5 mg/ml de BSA e 50 ng/ml de PDGF (PDGF), ou DMEM contendo SFB 10% (SFB). Ao fim do período de incubação as amostras foram fixadas em formaldeído 3,7%, incubadas com iodeto de propídeo 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e RNase DNase-free 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e montadas entre lâmina e laminula com o auxílio de Fluoromount G. O número de células migratórias foi estimado em microscópio Nikon Eclipse E600 pela contagem do número de núcleos fora da matriz aninhada em 15 campos microscópicos aleatórios para cada categoria amostral. Os dados mostrados são médias aritméticas e desvios padrão de experimentos em triplicata e representativos de três ensaios independentes.

3. Discussão

O presente trabalho foi realizado empregando fibroblastos como modelo de cultivo porque os fenômenos de remodelamento de MEC e migração celular foram analisados em maior detalhes neste tipo celular. Ainda que a maior parte dos tumores malignos tenham origem epitelial, claramente a capacidade de invadir tecidos adjacentes está ligada ao fenômeno de transição epitelial para mesenquimal (EMT) o qual, entre outras coisas, causa uma alteração no fenótipo das células epiteliais tornando-as similares a fibroblastos [324, 350]. Por outro lado, a EMT também está relacionada com o aparecimento de miofibroblastos e tecidos fibrosos a volta dos tumores, os quais podem regular a progressão tumoral [351, 352, 353, 354, 355]. Considerando que a EMT pode dar origem a células altamente invasivas ou altamente contráteis, compreender os mecanismos regulatórios e relações entre estes dois mecanismos torna-se particularmente importante.

Os mecanismos de regulação do remodelamento de colágeno, em particular, são ainda pouco compreendidos e a transformação celular parece exercer alterações nesta regulação. Estudos anteriores demonstraram que fibroblastos murinos e humanos transformados com o vírus SV40, assim como uma linhagem de osteosarcoma de ratos, exibiram diminuição na habilidade de contrair géis de colágeno e nós pudemos reproduzir resultados semelhantes com células da linhagem SV589. Entretanto, os antígenos do vírus SV40 empregados na transformação celular perturbam as atividades de diversas proteínas. Por exemplo, o antígeno *small-T* do SV40 inibe a atividade da proteína fosfatase 2A (PP2A), que é responsável pela maior parte da atividade de fosfatases da classe serina-treonina nas células, e é responsável pela regulação de muitas vias de sinalização [356]. Neste sentido, um dos objetivos deste trabalho foi determinar elementos genéticos definidos que poderiam responder pela reduzida habilidade de remodelamento de células transformadas. Foi proposto que os elementos envolvidos poderiam ser as proteínas p53, pRB e H-Ras. Para testar tal hipótese, células com as atividades das proteínas p53 e pRB suprimidas em conjunto, ou não, com a hiperativação de H-Ras foram ensaiadas em modelos de remodelamento de géis de colágeno do tipo I.

No presente trabalho demonstramos que a inibição das atividades de p53 e pRB pela expressão dos antígenos *large-T* do SV40 ou E6/E7, assim como a hiperativação da

proteína H-Ras, pela inserção de um alelo oncogênico constitutivamente ativo de H-Ras, não foram capazes de alterar a habilidade e remodelamento de fibroblastos humanos pré-senescentes. Este resultado é de certa forma surpreendente, uma vez a dinâmica de microfilamentos é essencial no remodelamento de géis de colágeno (vide a importância da atividade de miosina II e de *rufflings* de membrana; figura 5) e H-Ras apresenta diversas proteínas efetoras que participam de vias de sinalização que regulam a dinâmica de microfilamentos, regulando indiretamente proteínas como Rho, Rac e Cdc42 [357, 358]. Entretanto, a expressão de determinada proteína não garante fenótipos idênticos em linhagens celulares distintas. Por exemplo, não foi observado um aumento expressivo na atividade de *rufflings* de membrana de fibroblastos BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} quando comparados à linhagem parental (ver figura 19), ainda que a expressão deste alelo oncogênico tenha sido descrita como capaz de induzir este fenótipo [359, 360]. De todo modo, presumivelmente o aumento na atividade de *rufflings* de membrana deveria aumentar a habilidade de remodelamento de géis flutuantes pelas células [119] e, segundo a literatura [80, 81, 86] e os experimentos com a linhagem SV589, células transformadas apresentam justamente o fenótipo oposto.

Como a transformação de fibroblastos pós-crise com o emprego do vírus SV40 foi capaz de diminuir a habilidade de remodelamento celular [80], enquanto a transfecção de fibroblastos pré-crise com o antígeno *large-T* do SV40 não proporcionou o mesmo fenótipo, pode-se hipotetizar que o mecanismo responsável por reduzir a capacidade de remodelamento de MEC pelas células deve basear-se nas perturbações induzidas por outros antígenos do vírus SV40. Um candidato é o antígeno *small-T* do SV40, cuja principal proteína efetora é a PP2A. Esta fosfatase apresenta muitas proteínas efetoras e está implicada, por exemplo, na atividade fosfatásica de cadeias leves de miosina em células musculares [361]. Portanto, a proteína PP2A regula o fenômeno de contração celular, de modo que o antígeno *small-T* do SV40 poderia ter efeito significativo, ainda não descrito, na habilidade de remodelamento de MEC. Por outro lado, as vias regulatórias perturbadas durante o fenômeno de crise e imortalização a que células pós-crise se submetem também podem apresentar influência importante sobre a capacidade de remodelamento de MEC [80]. No entanto, estas perturbações são em grande parte desconhecidas.

Apesar da hiperativação de H-Ras não ter induzido uma alteração na habilidade de remodelamento de MEC, foi observado que células BR-5 com crescimento

bloqueado (*growth-arrested*) tiveram suas capacidades de remodelamento reduzidas. Este resultado sugere que a inibição do crescimento por contato (*contact inhibition of growth*) regula não apenas a progressão no ciclo celular, mas também a habilidade de remodelar MEC. Há pelo menos duas implicações importantes para esta hipótese. Primeiro, explicaria o comportamento de fibroblastos quiescentes em tecidos saudáveis, quando estas células não remodelam a MEC de modo significativo. Segundo, poderia ajudar a esclarecer aspectos importantes de patologias.

Por exemplo, dados da literatura demonstram que uma série de fatores podem ser responsáveis pela ausência de cicatrização em lesões crônicas causadas por úlceras [362], sendo um deles a presença de fibroblastos com características senescentes [363, 364]. O fato de o tratamento de úlceras com PDGF ser um dos mais efetivos em diversos testes clínicos [365, 366, 367], ao mesmo tempo em que também é um dos agonistas mais efetivos na indução *in vitro* do remodelamento de géis de colágeno por fibroblastos (figura 25 e [186]), sugere que a habilidade reduzida de fibroblastos senescentes em remodelar a MEC é o mecanismo responsável pela não cicatrização de lesões crônicas.

Sob o ponto de vista molecular, uma relação interessante entre remodelamento de MEC e bloqueio do crescimento pode ser estabelecida a partir de trabalhos com proteínas ERK1/2 da via de sinalização das MAP quinases. Em células normais, a ativação permanente de ERK1/2 é necessária para a progressão pela fase G1 [368]. Esta observação pode ser recapitulada em matrizes 3D *in vitro*, uma vez que fibroblastos cultivados em géis de colágeno flutuantes tornam-se quiescentes e apresentam diminuição na atividade de ERK e ciclina D1, concomitantemente ao aumento da atividade de p27^{Kip1}, um inibidor de quinases dependentes de ciclina (Cdk) [369, 370, 371]. Por outro lado, a quiescência observada em células cultivadas no modelo FMC de remodelamento claramente não inibe a contração dos géis de colágeno, sugerindo que mais estudos são necessários para se estabelecer uma clara relação entre remodelamento de MEC e bloqueio do crescimento celular.

Apesar dos dados a cerca do remodelamento de géis de colágeno, a hiperativação de H-Ras pela expressão de seu alelo constitutivamente ativo induziu o aumento na taxa de migração, tanto em lamínulas de vidro recobertas com colágeno do tipo I quanto no modelo de migração em matriz 3D aninhada. Em conjunto, as observações deste trabalho suportam a hipótese de que não há uma relação direta entre a

migração celular e a habilidade de fibroblastos humanos remodelarem matrizes de colágeno do tipo I, sugerindo que os fenômenos utilizam circuitos regulatórios pelo menos parcialmente distintos.

Assim como comentado a cerca da (falta de) relação entre expressão de H-Ras^{V12} e remodelamento de MEC, o desacoplamento entre os fenômenos de migração e remodelamento é um tanto contra-intuitivo uma vez que ambos os processos são dependentes de mecanismos comuns, como a atividade do citoesqueleto de actomiosina, *rufflings* de membrana e proteínas de sinalização como Rac, Rho, mDia1 e Rho quinase [119, 185, 196, 304, 372, 373]. De fato, uma correlação direta entre os dois fenômenos foi proposta em 1990 [156] e muitos trabalhos se seguiram demonstrando condições experimentais nas quais esta correlação é observada [157, 158, 159, 160, 161, 291].

Os ensaios com agonistas e inibidores, no entanto, corroboram com a hipótese de que não há uma relação clara entre os fenômenos de remodelamento e migração. O soro é frequentemente empregado como agonista em estudos de migração e remodelamento de MEC, mas sua composição é extremamente complexa. Alguns de seus componentes são o PDGF, o LPA e o S1P, sendo o primeiro de caráter protéico e os dois últimos de caráter lipídico [374, 375, 376, 377].

O PDGF foi descrito como o componente pró-migratório mais importante contido no soro [270, 378]. Este fator é capaz de induzir a migração de fibroblastos humanos em substratos de colágeno 2D e 3D mas não induz o remodelamento de géis no modelo SMC. Apesar disso, a inibição de um de seus efetores, a Rho quinase, inibe o remodelamento de matrizes flutuantes [119, 163, 196] e a migração em matrizes aninhadas, demonstrando que para este agonista há uma correlação direta entre migração e remodelamento pelo modelo FMC. Contudo, se levarmos em conta o modelo SMC, a correlação deixa de existir. O LPA, por outro lado, é um componente do soro que parece induzir o remodelamento de géis de colágeno independentemente do modelo empregado, mas não apresenta papel importante na migração celular. Já o S1P é um indutor razoável da contração de géis de colágeno [186], mas age como um potente inibidor da migração de fibroblastos humanos no modelo de matriz aninhada, e sua atividade inibitória reduz a atividade pró-migratória dos soros humano e fetal bovino [186]. A figura 45 mostra a regulação destes componentes do soro sobre os fenômenos

de migração celular e remodelamento de MEC, demonstrando claramente que estes fenômenos não estão diretamente relacionados.

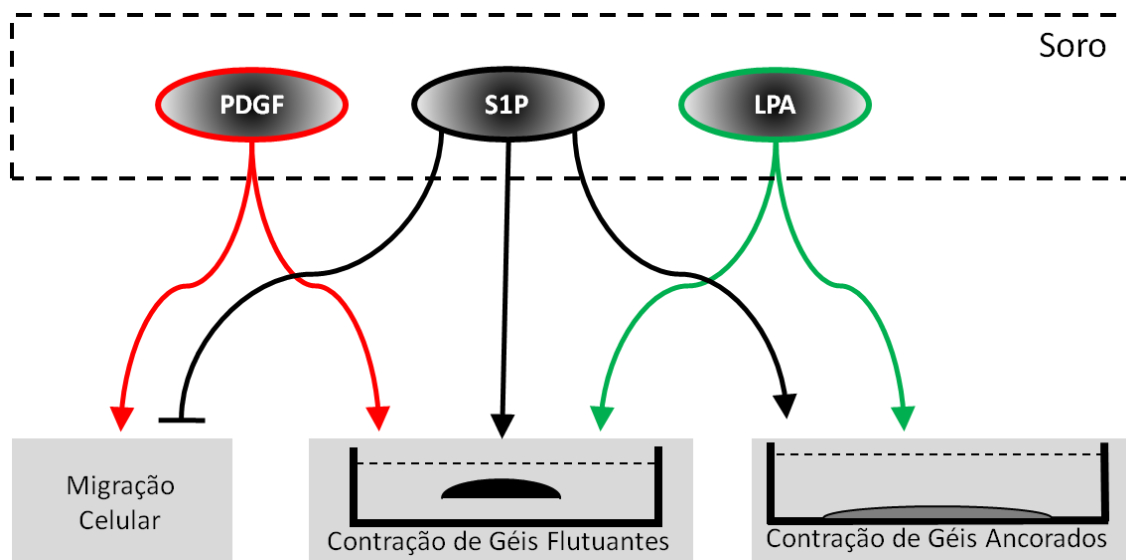


Figura 45. **Regulação por componentes do soro da migração e remodelamento de géis de colágeno do tipo I em fibroblastos humanos normais.** Modelo desenvolvido a partir de dados apresentados neste trabalho em conjunto com dados disponíveis na literatura.

Novos estudos bioquímicos tendo como alvo proteínas envolvidas nos fenômenos de migração e remodelamento de MEC serão necessários para compreender esta relação complexa. Uma pista, contudo, advém de estudo por Javelaud e colaboradores (2003), cujos resultados mostram que fibroblastos *jnk*^{-/-} (com os genes da proteína JNK deletados) exibem aumento da migração celular e diminuição na habilidade de remodelar géis de colágeno [379]. Curiosamente, dados da literatura sugerem que as vias de sinalização de p21ras e JNK poder estar inter-relacionadas. Por exemplo, ambas as proteínas são capazes de ativar c-Jun [380, 381] e evidências sugerem que a ativação de JNK e fosforilação de c-Jun são necessárias para a transformação celular por p21ras [382]. No entanto, a ativação de JNK já foi descrita tanto em via de sinalização dependente H-Ras quanto em via independente desta proteína [383].

Portanto, apesar da relação controversa, parece atraente sugerir que a relação entre os fenômenos migratório e de remodelamento de MEC possa estar relacionada às vias de sinalização de p21ras e JNK, assim como a ativação diferencial das vias de

MAP quinases por estas proteínas [383, 384]. Ainda que neste trabalho, utilizando fibroblastos humanos, nós não tenhamos observado alteração na capacidade de remodelamento pela expressão de H-Ras^{V12}, é possível que em outras linhagens celulares tais efeitos inibitórios do remodelamento possam ser observados. Além disso, é possível que diferentes membros da família Ras, como K-Ras ou N-Ras, possam apresentar diferentes resultados no que tange a regulação da contração de géis de colágeno.

De todo modo, não podemos deixar de citar que há condições experimentais nas quais observamos uma correlação direta entre migração celular e remodelamento de MEC como, por exemplo, nos ensaios de *time-lapse* da migração em matrizes aninhadas. Antes de as células iniciarem a migração celular, há um período da incubação das matrizes aninhadas denominado fase *lag* onde claramente há um fluxo (ou translocamento) do colágeno da matriz externa em direção a matriz aninhada. Este translocamento de colágeno também foi descrito em matrizes não uniformes de colágeno/fibronectina, e naquele modelo não dependia da presença de células [385].

Neste modelo, o fluxo de colágeno da matriz externa não só depende da presença das células [291], como parece depender da atividade migratória destas células. Isto porque, o emprego de inibidores da polimerização de microfilamentos (citocalasina D) e da atividade de miosina II (blebistatina) e Rho quinase (Y27632) inibem ambos os processos de migração e de translocação do colágeno induzidos por PDGF [291]. Além disso, o fluxo de colágeno só ocorre quando há migração celular, como quando fibroblastos das linhagens BR-5, BR-5 E6/E7 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} são tratados com PDGF, ou quando as células BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} são tratadas com SFB. Porém, quando fibroblastos BR-5 e BR-5 E6/E7 são tratados com SFB, não se observa nem o translocamento do colágeno na matriz externa nem a migração celular. É importante notar, ainda, que o fato de haver condições experimentais nas quais não se observa translocamento de colágeno da matriz externa exclui a hipótese de que este fluxo seja um artefato de técnica decorrente de efeitos físicos, tal como o aquecimento da amostra pela iluminação, o qual poderia criar um fluxo dos líquidos na amostra.

Foi levantada a hipótese de que a diferença de densidade da MEC entre as matrizes aninhada (que segundo estimativas deste trabalho pode chegar a mais de 30 mg/mL) e externa (1,5 mg/mL) seja responsável pela fase *lag*. Em substratos elásticos 2D recobertos com colágeno, as células normais e transformadas tendem a se mover de

substratos mais flácidos para substratos mais rígidos, um fenômeno que foi denominado durotaxis [237, 386, 387]. Se isto também for válido para matrizes 3D, a fase *lag* poderia corresponder a um período no qual as células remodelam a matriz externa via mecanismos migratórios (tração do substrato) até um limiar no qual a densidade da matriz externa permitiria o translocamento da célula na direção da matriz externa. Esta hipótese é reforçada por estudos com modelos de matrizes aninhadas ancoradas ao substrato (como as empregadas neste trabalho) ou flutuantes [291]. Nas matrizes ancoradas, após a fase *lag* há uma diminuição na translocação do colágeno e um aumento na migração celular. Em matrizes aninhadas flutuantes, por outro lado, há uma translocação de colágeno muito mais intensa e as células não conseguem migrar.

A figura 46 é uma representação gráfica da hipótese formulada e corroborada pelas observações deste e outros trabalhos a cerca da relação entre migração celular e translocamento de colágeno no modelo de matriz aninhada. Se a matriz de colágeno na qual as células estão inseridas for mais resistente do que as forças impressas pela tração celular induzida por mecanismos migratórios, então a célula se move e o colágeno é pouco ou nada translocado. Se, por outro lado, o substrato for pouco resistente e se deformar em virtude das forças tracionais da célula, esta não se move com eficácia e seu mecanismo migratório induz o translocamento do substrato tracionado. Fenômeno semelhante foi descrito com células se espalhando sobre superfícies de silicone líquido: se a viscosidade do líquido não for suficientemente alta para resistir a projeção de extensões de membrana, então o líquido flui e as células permanecem arredondadas [388].

Curiosamente fibroblastos transfectados com o alelo oncogênico H-Ras^{V12} não apresentam a mesma relação de redução da migração celular quando há diferenças significativas de densidade entre as matrizes aninhada e externa. De fato, a taxa de migração diminui quando se empregam matrizes remodeladas por tempos mais longos (matrizes aninhadas mais densas), mas apenas entre 25 e 50% e não em até 90% como ocorre com fibroblastos da linhagem BR-5. Portanto, a hiperativação de H-Ras torna a migração celular menos dependente do grau de remodelamento da matriz. Algumas explicações possíveis para este fenômeno são: (1) fibroblastos da linhagem BR-5 tornam-se quiescentes e/ou “desativam” sua maquinaria migratória em maior grau quando há remodelamento por longos períodos do que fibroblastos BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12}; (2) a hiperativação de H-Ras induz ao aumento da degradação proteolítica

pericelular; e, (3) fibroblastos BR-5 desenvolvem adesões célula-célula e/ou célula-MEC que inibem sua migração, enquanto células que expressam H-Ras^{V12} não as desenvolvem ou desenvolvem em menor grau.

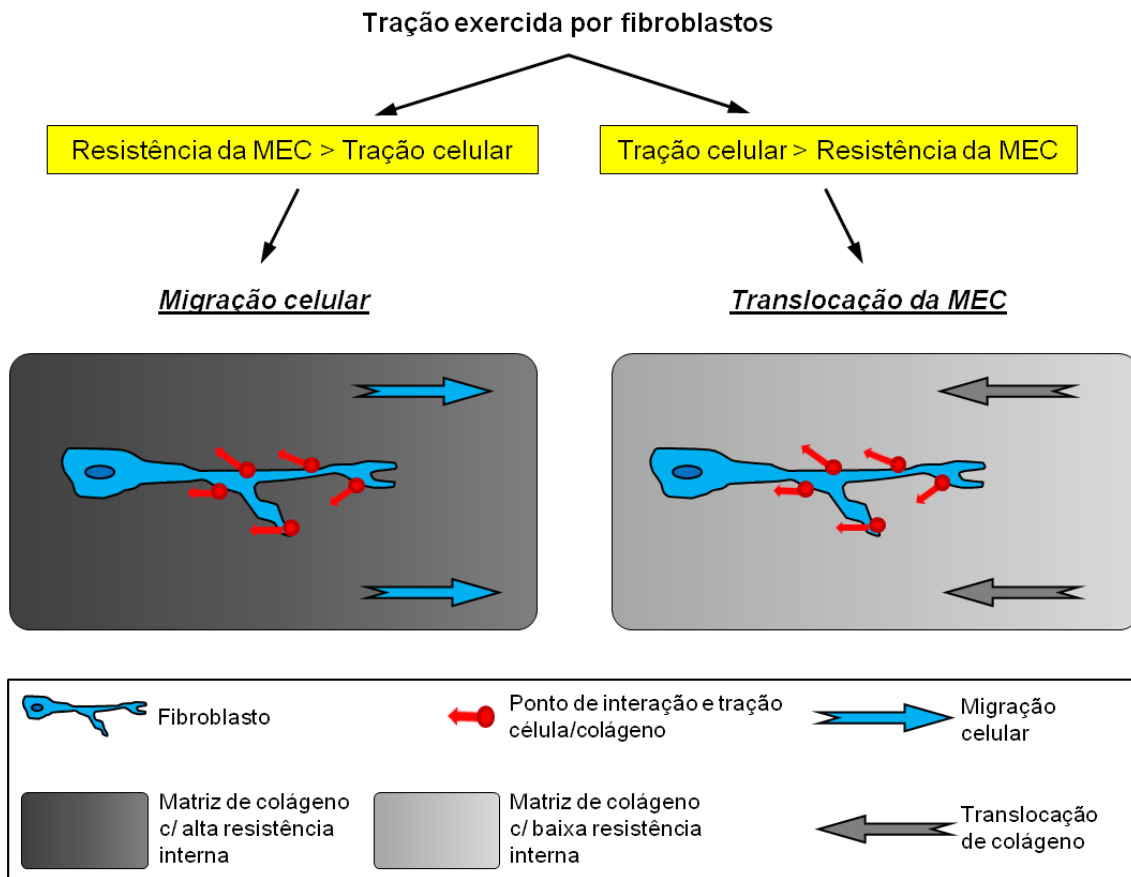


Figura 46. Modelo da relação entre migração celular e translocação de colágeno.

Alguns dados publicados na literatura corroboram com estas hipóteses. Por exemplo, fibroblastos cultivados por longos períodos em matrizes flutuantes se tornam quiescentes [369, 370], e apresentam diminuição na síntese de RNA mensageiro [389]. Além disso, células tumorigênicas costumam apresentar um aumento na expressão de proteases, especialmente de metaloproteases de matriz (MMPs) [390]. Por fim, a adesão célula-célula também pode apresentar papel fundamental nas diferenças observadas entre células normais e transformadas com H-Ras^{V12}, uma vez que miofibroblastos presentes em lesões contraídas modificam a expressão de caderinas na sua membrana, de caderina-N (no início da lesão) para caderina-OB [391].

Por enquanto não podemos distinguir entre estas três hipóteses. Entretanto, resultados preliminares de *western blot* e imunofluorescência mostram que apesar da taxa de expressão de caderina-N, β -catenina e junções do tipo Gap serem semelhantes em fibroblastos das linhagens BR-5 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} (dados não mostrados), a distribuição de β -catenina é alterada entre fibroblastos BR-5 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12}: enquanto na primeira linhagem há marcação quase que exclusiva na interface entre as células (provavelmente localizadas em junções aderentes), na segunda a marcação é difusa pelo corpo celular e bastante baixa nas interfaces.

Estas hipóteses não são mutuamente exclusivas e poderiam ser todas verdadeiras, caso no qual haveria um sinergismo de fenômenos que permitiriam a migração de células com Ras hiperativada de tecidos mais densos para tecidos mais frouxos. Este resultado pode ser importante para o estudo de diversos fenômenos como, por exemplo, a metástase. Os trabalhos que descrevem a metastização de células tumorais costumam reportar que a perda das adesões célula-célula e célula-MEC associadas a produção e secreção de proteases são os fenômenos fundamentais para o início da metástase. Estas descrições costumam ignorar o fato de haver tecidos fibróticos a volta da maior parte dos tumores, chamadas estromas reativos ou desmoplasias [352]. Os resultados deste trabalho sugerem que células imortalizadas pela expressão de HTERT e E6/E7 (linhagens BR-5 e B-5 E6/E7) apresentam muita dificuldade de migrar de matrizes bastante densas para outras menos compactas. Por outro lado, fibroblastos com atividade aumentada de H-Ras migram entre estes meios de densidades distintas com alguma facilidade. Portanto, a transformação pela hiperativação de p21ras poderia tornar as células não apenas mais migratórias e com menos adesões célula-célula, mas também capazes de migrar através do denso estroma reativo para o tecido saudável mecanicamente mais frágil.

4. Conclusão

Das hipóteses testadas no presente trabalho as duas primeiras, que diziam respeito a redução na habilidade de remodelamento induzida pela expressão de genes oncogênicos específicos, não se confirmaram. Pode-se afirmar que elementos descritos como necessários à transformação celular *in vitro*, como a inibição da expressão de p53 e pRB e o aumento da atividade de H-Ras, não são os mecanismos pelos quais células transformadas tornam-se menos capazes de contrair géis de colágeno.

A hipótese de que a expressão de H-Ras^{V12} aumenta a taxa de migração de fibroblastos humanos em matrizes 3D de colágeno do tipo I foi parcialmente confirmada. De fato, há um aumento na taxa de migração destas células independentemente do agonista empregado ou do nível de remodelamento da matriz aninhada. No entanto, uma vez que as células estejam na matriz externa do modelo de matriz aninhada, as velocidades médias das linhagens BR-5 e BR-5 E6/E7 H-Ras^{V12} são bastante semelhantes. Este dado pode indicar que as diferenças na taxa de migração observadas sejam relativas a habilidade das linhagens em transpor a barreira entre matriz aninhada e externa do modelo empregado. Os dados relativos a migração celular entre matrizes de diferentes densidades parecem confirmar esta hipótese.

A última hipótese, a qual diz respeito a inexistência de uma relação direta entre migração celular e remodelamento de MEC, foi confirmada. Os resultados deste trabalho demonstram que a contração de géis de colágeno do tipo I pode ou não apresentar relação direta com a taxa de migração celular, dependendo do ensaio utilizado. Em conjunto, as observações sugerem que os fenômenos de remodelamento de MEC e migração celular podem estar acoplados através de certas vias de sinalização, porém outras vias são exclusivas e atuam em cada mecanismo separadamente. Assim, há diferenças significativas no conjunto de mecanismos de cada fenômeno que impedem, no presente momento, a formalização de qualquer correlação entre eles.

5. Referências

- [1] Harrison, R. G. Experiments in transplanting limbs and their bearings on the problems of the development of nerves. J Exp Zool, v. 4, p.239–281. 1907.
- [2] _____. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. J Exp Zool, v.9, p.787–846. 1910.
- [3] Ringer, S. Concerning the Influence exerted by each of the Constituents of the Blood on the Contraction of the Ventricle. J Physiol, v.3, n.5-6, Aug, p.380-93. 1882.
- [4] Roux, W. Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryo. Zeitschr Biol, v.21, p.411-526. 1885.
- [5] Treviranus, L. C. Beyträge zur Pflanzenphysiologie. 1811
- [6] Dutrochet, H. Recherches Anatomiques et Physiologiques sur la Structure Intime des Animaux et des Végétaux et Sur Leur Motilité. Paris: Baillière, J. B. . 1824. 233 p.
- [7] Schleiden, M. J. Beiträge zur Phytogenesis. Arch Anat Physiol Wiss Med, v.13, p.137–176 1838.
- [8] Schwann, T. Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen. Berlin: Sander'schen Buchhandlung. 1839
- [9] Virchow, R. C. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre: 20 Vorlesungen, gehalten während der Monate Februar, März und April 1858 im Pathologischen Institut zu Berlin. Berlin: Hirschwald. 1858. 440 p.
- [10] Darwin, C. On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. London: John Murray. 1859
- [11] Carrel, A. e M. T. Burrows. Cultivation of tissues in vitro and its technique. J Exp Med, v.13, n.3, p.387-396. 1911.
- [12] _____. An addition to the technique of the cultivation of tissues in vitro. J Exp Med v.14, n.3, p.244-247. 1911.
- [13] Carrel, A. A method for the physiological study of tissues in vitro. J Exp Med, v.38, n.4, p.407-418. 1923.
- [14] Abercrombie, M., M. H. Flint, *et al.* Wound contraction in relation to collagen formation in scorbutic guinea pigs. J Embryol Exp Morphol, v.4, p.167-175. 1956.
- [15] Billingham, R. E. e P. S. Russell. Studies on wound healing, with special reference to the phenomenon of contracture in experimental wounds in rabbits' skin. Ann Surg, v.144, n.6, Dec, p.961-81. 1956.
- [16] Watts, G. T., H. C. Grillo, *et al.* Studies in Wound Healing: II. The Role of Granulation Tissue in Contraction. Ann Surg, v.148, n.2, Aug, p.153-60. 1958.

- [17] Gabbiani, G., B. J. Hirschel, *et al.* Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. J Exp Med, v.135, n.4, Apr 1, p.719-34. 1972.
- [18] Skalli, O. e G. Gabbiani. The biology of the myofibroblast relationship to wound contraction and fibrocontractive disease. In: R. A. F. Clark e P. M. Henson (Ed.). The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. New York: Plenum Press, 1988. The biology of the myofibroblast relationship to wound contraction and fibrocontractive disease, p.373-402
- [19] Elsdale, T. e J. Bard. Collagen substrata for studies on cell behavior. J Cell Biol, v.54, n.3, Sep, p.626-37. 1972.
- [20] Niewiarowski, S. e S. Goldstein. Interaction of cultured human fibroblasts with fibrin: modification by drugs and aging in vitro. J Lab Clin Med, v.82, n.4, Oct, p.605-10. 1973.
- [21] Bell, E., B. Ivarsson, *et al.* Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A, v.76, n.3, Mar, p.1274-8. 1979.
- [22] Lanza, R. P., R. S. Langer, *et al.*, Eds. Principles of Tissue Engineering. New York: Academic Press, p.808, 1^a ed. 1997.
- [23] Ingber, D. E. The architecture of life. Sci Am, v.278, n.1, Jan, p.48-57. 1998.
- [24] Folkman, J. e A. Moscona. Role of cell shape in growth control. Nature, v.273, n.5661, Jun 1, p.345-9. 1978.
- [25] Engler, A. J., S. Sen, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell, v.126, n.4, Aug 25, p.677-89. 2006.
- [26] Ingber, D. E. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. Faseb J, v.20, n.7, May, p.811-27. 2006.
- [27] Orr, A. W., B. P. Helmke, *et al.* Mechanisms of mechanotransduction. Dev Cell, v.10, n.1, Jan, p.11-20. 2006.
- [28] Vogel, V. Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. Annu Rev Biophys Biomol Struct, v.35, p.459-88. 2006.
- [29] Eastwood, M., D. A. Mcgrouther, *et al.* Fibroblast responses to mechanical forces. Proc Inst Mech Eng [H], v.212, n.2, p.85-92. 1998.
- [30] Rhee, S. e F. Grinnell. Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. Adv Drug Deliv Rev, v.59, n.13, Nov 10, p.1299-305. 2007.
- [31] Chen, C. S., M. Mrksich, *et al.* Geometric control of cell life and death. Science, v.276, n.5317, May 30, p.1425-8. 1997.
- [32] Carragher, N. O. e M. C. Frame. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. Trends Cell Biol, v.14, n.5, May, p.241-9. 2004.

- [33] Wozniak, M. A., K. Modzelewska, *et al.* Focal adhesion regulation of cell behavior. Biochim Biophys Acta, v.1692, n.2-3, Jul 5, p.103-19. 2004.
- [34] Zaidel-Bar, R., M. Cohen, *et al.* Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. Biochem Soc Trans, v.32, n.Pt3, Jun, p.416-20. 2004.
- [35] Zamir, E. e B. Geiger. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. J Cell Sci, v.114, n.Pt 20, Oct, p.3583-90. 2001.
- [36] Bershadsky, A., M. Kozlov, *et al.* Adhesion-mediated mechanosensitivity: a time to experiment, and a time to theorize. Curr Opin Cell Biol, v.18, n.5, Oct, p.472-81. 2006.
- [37] Bershadsky, A. D., C. Ballestrem, *et al.* Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. Eur J Cell Biol, v.85, n.3-4, Apr, p.165-73. 2006.
- [38] Nakagawa, S., P. Pawelek, *et al.* Long-term culture of fibroblasts in contracted collagen gels: effects on cell growth and biosynthetic activity. J Invest Dermatol, v.93, n.6, Dec, p.792-8. 1989.
- [39] _____. Extracellular matrix organization modulates fibroblast growth and growth factor responsiveness. Exp Cell Res, v.182, n.2, Jun, p.572-82. 1989.
- [40] Brown, R. A., R. Prajapati, *et al.* Tensional homeostasis in dermal fibroblasts: mechanical responses to mechanical loading in three-dimensional substrates. J Cell Physiol, v.175, n.3, Jun, p.323-32. 1998.
- [41] Wehrle-Haller, B. e B. A. Imhof. Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. Int J Biochem Cell Biol, v.35, n.1, Jan, p.39-50. 2003.
- [42] Zhong, C., M. Chrzanowska-Wodnicka, *et al.* Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. J Cell Biol, v.141, n.2, Apr 20, p.539-51. 1998.
- [43] Ohashi, T., D. P. Kiehart, *et al.* Dynamics and elasticity of the fibronectin matrix in living cell culture visualized by fibronectin-green fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.5, Mar 2, p.2153-8. 1999.
- [44] Smith, M. L., D. Gourdon, *et al.* Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. PLoS Biol, v.5, n.10, Oct 2, p.e268. 2007.
- [45] Leopoldt, D., H. F. Yee, Jr., *et al.* Calyculin-A induces focal adhesion assembly and tyrosine phosphorylation of p125(Fak), p130(Cas), and paxillin in Swiss 3T3 cells. J Cell Physiol, v.188, n.1, Jul, p.106-19. 2001.
- [46] Szczepanowska, J., E. D. Korn, *et al.* Activation of myosin in HeLa cells causes redistribution of focal adhesions and F-actin from cell center to cell periphery. Cell Motil Cytoskeleton, v.63, n.6, Jun, p.356-74. 2006.
- [47] Xia, D., J. T. Stull, *et al.* Myosin phosphatase targeting subunit 1 affects cell migration by regulating myosin phosphorylation and actin assembly. Exp Cell Res, v.304, n.2, Apr 1, p.506-17. 2005.

- [48] Grosheva, I., J. L. Vittitow, *et al.* Caldesmon effects on the actin cytoskeleton and cell adhesion in cultured HTM cells. Exp Eye Res, v.82, n.6, Jun, p.945-58. 2006.
- [49] Totsukawa, G., Y. Wu, *et al.* Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. J Cell Biol, v.164, n.3, Feb 2, p.427-39. 2004.
- [50] Helfman, D. M., E. T. Levy, *et al.* Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions. Mol Biol Cell, v.10, n.10, Oct, p.3097-112. 1999.
- [51] Chrzanoska-Wodnicka, M. e K. Burridge. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. J Cell Biol, v.133, n.6, Jun, p.1403-15. 1996.
- [52] Volberg, T., B. Geiger, *et al.* Effect of protein kinase inhibitor H-7 on the contractility, integrity, and membrane anchorage of the microfilament system. Cell Motil Cytoskeleton, v.29, n.4, p.321-38. 1994.
- [53] Riveline, D., E. Zamir, *et al.* Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. J Cell Biol, v.153, n.6, Jun 11, p.1175-86. 2001.
- [54] Balaban, N. Q., U. S. Schwarz, *et al.* Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. Nat Cell Biol, v.3, n.5, May, p.466-72. 2001.
- [55] Tan, J. L., J. Tien, *et al.* Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.4, Feb 18, p.1484-9. 2003.
- [56] Choquet, D., D. P. Felsenfeld, *et al.* Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. Cell, v.88, n.1, Jan 10, p.39-48. 1997.
- [57] Galbraith, C. G., K. M. Yamada, *et al.* The relationship between force and focal complex development. J Cell Biol, v.159, n.4, Nov 25, p.695-705. 2002.
- [58] Pelham, R. J., Jr. e Y. Wang. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.25, Dec 9, p.13661-5. 1997.
- [59] Saez, A., A. Buguin, *et al.* Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces? Biophys J, v.89, n.6, Dec, p.L52-4. 2005.
- [60] Yeung, T., P. C. Georges, *et al.* Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. Cell Motil Cytoskeleton, v.60, n.1, Jan, p.24-34. 2005.
- [61] Vogel, V. e M. Sheetz. Local force and geometry sensing regulate cell functions. Nat Rev Mol Cell Biol, v.7, n.4, Apr, p.265-75. 2006.
- [62] Cukierman, E., R. Pankov, *et al.* Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. Science, v.294, n.5547, Nov 23, p.1708-12. 2001.

- [63] Katz, B. Z., E. Zamir, *et al.* Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. Mol Biol Cell, v.11, n.3, Mar, p.1047-60. 2000.
- [64] Dalby, M. J., M. O. Riehle, *et al.* Morphological and microarray analysis of human fibroblasts cultured on nanocolumns produced by colloidal lithography. Eur Cell Mater, v.9, p.1-8; discussion 8. 2005.
- [65] _____. Use of nanotopography to study mechanotransduction in fibroblasts--methods and perspectives. Eur J Cell Biol, v.83, n.4, May, p.159-69. 2004.
- [66] Martines, E., K. Mcghee, *et al.* A parallel-plate flow chamber to study initial cell adhesion on a nanofeatured surface. IEEE Trans Nanobioscience, v.3, n.2, Jun, p.90-5. 2004.
- [67] Patel, A. J., M. Lazdunski, *et al.* Lipid and mechano-gated 2P domain K(+) channels. Curr Opin Cell Biol, v.13, n.4, Aug, p.422-8. 2001.
- [68] Tarricone, C., B. Xiao, *et al.* The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. Nature, v.411, n.6834, May 10, p.215-9. 2001.
- [69] Van Aelst, L., T. Joneson, *et al.* Identification of a novel Rac1-interacting protein involved in membrane ruffling. Embo J, v.15, n.15, Aug 1, p.3778-86. 1996.
- [70] Williger, B. T., J. Ostermann, *et al.* Arfaptin 1, an ARF-binding protein, inhibits phospholipase D and endoplasmic reticulum/Golgi protein transport. FEBS Lett, v.443, n.2, Jan 25, p.197-200. 1999.
- [71] Nagasawa, S. Y., N. Takuwa, *et al.* Inhibition of Rac activation as a mechanism for negative regulation of actin cytoskeletal reorganization and cell motility by cAMP. Biochem J, v.385, n.Pt 3, Feb 1, p.737-44. 2005.
- [72] Randazzo, P. A. e D. S. Hirsch. Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. Cell Signal, v.16, n.4, Apr, p.401-13. 2004.
- [73] Tapon, N. e A. Hall. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. Curr Opin Cell Biol, v.9, n.1, Feb, p.86-92. 1997.
- [74] Turner, C. E., K. A. West, *et al.* Paxillin-ARF GAP signaling and the cytoskeleton. Curr Opin Cell Biol, v.13, n.5, Oct, p.593-9. 2001.
- [75] Alberts, B., A. Johnson, *et al.* Molecular biology of the cell. New York: Garland Science. 2002. xxxiv, 1463, [86] p. p.
- [76] Friedl, P., Y. Hegerfeldt, *et al.* Collective cell migration in morphogenesis and cancer. Int J Dev Biol, v.48, n.5-6, p.441-9. 2004.
- [77] Mueller-Klieser, W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. Am J Physiol, v.273, n.4 Pt 1, Oct, p.C1109-23. 1997.
- [78] Cheema, U., R. A. Brown, *et al.* Spatially defined oxygen gradients and vascular endothelial growth factor expression in an engineered 3D cell model. Cell Mol Life Sci, Nov 13. 2007.

- [79] Keith, B. e M. C. Simon. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. Cell, v.129, n.3, May 4, p.465-72. 2007.
- [80] Steinberg, B. M., K. Smith, *et al.* Establishment and transformation diminish the ability of fibroblasts to contract a native collagen gel. J Cell Biol, v.87, n.1, Oct, p.304-8. 1980.
- [81] Bellows, C. G., A. H. Melcher, *et al.* Contraction and organization of collagen gels by cells cultured from periodontal ligament, gingiva and bone suggest functional differences between cell types. J Cell Sci, v.50, Aug, p.299-314. 1981.
- [82] Grinnell, F. e C. R. Lamke. Reorganization of hydrated collagen lattices by human skin fibroblasts. J Cell Sci, v.66, Mar, p.51-63. 1984.
- [83] Harris, A. K., D. Stopak, *et al.* Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. Nature, v.290, n.5803, Mar 19, p.249-51. 1981.
- [84] Haemmerli, G., B. Arnold, *et al.* Cellular motility on glass and in tissues: similarities and dissimilarities. Cell Biol Int Rep, v.7, n.9, Sep, p.709-25. 1983.
- [85] Schor, S. L., T. D. Allen, *et al.* Cell migration through three-dimensional gels of native collagen fibres: collagenolytic activity is not required for the migration of two permanent cell lines. J Cell Sci, v.46, Dec, p.171-86. 1980.
- [86] Buttle, D. J. e H. P. Ehrlich. Comparative studies of collagen lattice contraction utilizing a normal and a transformed cell line. J Cell Physiol, v.116, n.2, Aug, p.159-66. 1983.
- [87] Yang, S., J. Graham, *et al.* Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. Am J Pathol, v.155, n.3, Sep, p.887-95. 1999.
- [88] Montesano, R. e L. Orci. Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro. Cell, v.42, n.2, Sep, p.469-77. 1985.
- [89] Ng, C. P., C. L. Helm, *et al.* Interstitial flow differentially stimulates blood and lymphatic endothelial cell morphogenesis in vitro. Microvasc Res, v.68, n.3, Nov, p.258-64. 2004.
- [90] Montesano, R., P. Mouron, *et al.* Vascular outgrowths from tissue explants embedded in fibrin or collagen gels: a simple in vitro model of angiogenesis. Cell Biol Int Rep, v.9, n.10, Oct, p.869-75. 1985.
- [91] O'brien, L. E., K. Tang, *et al.* ERK and MMPs sequentially regulate distinct stages of epithelial tubule development. Dev Cell, v.7, n.1, Jul, p.21-32. 2004.
- [92] Bissell, M. J., D. C. Radisky, *et al.* The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. Differentiation, v.70, n.9-10, Dec, p.537-46. 2002.
- [93] Brown, A. F. Neutrophil granulocytes: adhesion and locomotion on collagen substrata and in collagen matrices. J Cell Sci, v.58, Dec, p.455-67. 1982.

- [94] Entschladen, F., B. Niggemann, *et al.* Differential requirement of protein tyrosine kinases and protein kinase C in the regulation of T cell locomotion in three-dimensional collagen matrices. J Immunol, v.159, n.7, Oct 1, p.3203-10. 1997.
- [95] Friedl, P., F. Entschladen, *et al.* CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. Eur J Immunol, v.28, n.8, Aug, p.2331-43. 1998.
- [96] Friedl, P., P. B. Noble, *et al.* T lymphocyte locomotion in a three-dimensional collagen matrix. Expression and function of cell adhesion molecules. J Immunol, v.154, n.10, May 15, p.4973-85. 1995.
- [97] Roeder, B. A., K. Kokini, *et al.* Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure. J Biomech Eng, v.124, n.2, Apr, p.214-22. 2002.
- [98] Guidry, C. e F. Grinnell. Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. J Cell Sci, v.79, Nov, p.67-81. 1985.
- [99] Cheung, D. T. e M. E. Nimni. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen. Connect Tissue Res, v.10, n.2, p.201-16. 1982.
- [100] Saito, H., S. Murabayashi, *et al.* Characterization of alkali-treated collagen gels prepared by different crosslinkers. J Mater Sci Mater Med, Sep 13. 2007.
- [101] _____. Unusual cell adhesion and antithrombogenic behavior of citric acid-cross-linked collagen matrices. Biomacromolecules, v.8, n.6, Jun, p.1992-8. 2007.
- [102] Weadock, K., R. M. Olson, *et al.* Evaluation of collagen crosslinking techniques. Biomater Med Devices Artif Organs, v.11, n.4, p.293-318. 1983.
- [103] Girton, T. S., T. R. Oegema, *et al.* Exploiting glycation to stiffen and strengthen tissue equivalents for tissue engineering. J Biomed Mater Res, v.46, n.1, Jul, p.87-92. 1999.
- [104] Hey, K. B., C. M. Lachs, *et al.* Crosslinked fibrous collagen for use as a dermal implant: control of the cytotoxic effects of glutaraldehyde and dimethylsuberimidate. Biotechnol Appl Biochem, v.12, n.1, Feb, p.85-93. 1990.
- [105] Speer, D. P., M. Chvapil, *et al.* Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. J Biomed Mater Res, v.14, n.6, Nov, p.753-64. 1980.
- [106] Wood, G. C. e M. K. Keech. The formation of fibrils from collagen solutions. 1. The effect of experimental conditions: kinetic and electron-microscope studies. Biochem J, v.75, Jun, p.588-98. 1960.
- [107] Saltzman, W. M., M. L. Radomsky, *et al.* Antibody diffusion in human cervical mucus. Biophys J, v.66, n.2 Pt 1, Feb, p.508-15. 1994.

- [108] Silver, F. H., L. M. Siperko, *et al.* Mechanobiology of force transduction in dermal tissue. *Skin Res Technol*, v.9, n.1, Feb, p.3-23. 2003.
- [109] Allen, T. D., S. L. Schor, *et al.* An ultrastructural review of collagen gels, a model system for cell-matrix, cell-basement membrane and cell-cell interactions. *Scan Electron Microsc*, n.Pt 1, p.375-90. 1984.
- [110] Barocas, V. H. e R. T. Tranquillo. A finite element solution for the anisotropic biphasic theory of tissue-equivalent mechanics: the effect of contact guidance on isometric cell traction measurement. *J Biomech Eng*, v.119, n.3, Aug, p.261-8. 1997.
- [111] Knapp, D. M., V. H. Barocas, *et al.* Rheology of reconstituted type I collagen gel in confined compression. *J Rheol*, v.41, n.5, Sep, p.971-93. 1997.
- [112] Petroll, W. M., L. Ma, *et al.* Direct correlation of collagen matrix deformation with focal adhesion dynamics in living corneal fibroblasts. *J Cell Sci*, v.116, n.Pt 8, Apr 15, p.1481-91. 2003.
- [113] Kim, A., N. Lakshman, *et al.* Quantitative assessment of local collagen matrix remodeling in 3-D culture: the role of Rho kinase. *Exp Cell Res*, v.312, n.18, Nov 1, p.3683-92. 2006.
- [114] Friedl, P., K. Maaser, *et al.* Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of alpha2 and beta1 integrins and CD44. *Cancer Res*, v.57, n.10, May 15, p.2061-70. 1997.
- [115] Wyckoff, J. B., S. E. Pinner, *et al.* ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr Biol*, v.16, n.15, Aug 8, p.1515-23. 2006.
- [116] Wolf, K., I. Mazo, *et al.* Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*, v.160, n.2, Jan 20, p.267-77. 2003.
- [117] Wolf, K., Y. I. Wu, *et al.* Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol*, v.9, n.8, Aug, p.893-904. 2007.
- [118] Bellows, C. G., A. H. Melcher, *et al.* Association between tension and orientation of periodontal ligament fibroblasts and exogenous collagen fibres in collagen gels in vitro. *J Cell Sci*, v.58, Dec, p.125-38. 1982.
- [119] Rhee, S. e F. Grinnell. P21-activated kinase 1: convergence point in PDGF- and LPA-stimulated collagen matrix contraction by human fibroblasts. *J Cell Biol*, v.172, n.3, Jan 30, p.423-32. 2006.
- [120] Clark, R. A. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol*, v.13, n.5 Pt 1, Nov, p.701-25. 1985.
- [121] Singer, Ii, D. W. Kawka, *et al.* In vivo co-distribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue: immunofluorescence and electron microscope studies of the fibronexus at the myofibroblast surface. *J Cell Biol*, v.98, n.6, Jun, p.2091-106. 1984.

- [122] Nurden, A. T. Glanzmann thrombasthenia. Orphanet J Rare Dis, v.1, p.10. 2006.
- [123] Donati, M. B., G. Balconi, *et al.* Skin fibroblasts from a patient with Glanzmann's thrombasthenia do not induce fibrin clot retraction. Thromb Res, v.10, n.1, Jan, p.173-4. 1977.
- [124] Darby, I., O. Skalli, *et al.* Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. Lab Invest, v.63, n.1, Jul, p.21-9. 1990.
- [125] Eddy, R. J., J. A. Petro, *et al.* Evidence for the nonmuscle nature of the "myofibroblast" of granulation tissue and hypertrophic scar. An immunofluorescence study. Am J Pathol, v.130, n.2, Feb, p.252-60. 1988.
- [126] Welch, M. P., G. F. Odland, *et al.* Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. J Cell Biol, v.110, n.1, Jan, p.133-45. 1990.
- [127] Petroll, W. M., H. D. Cavanagh, *et al.* Quantitative analysis of stress fiber orientation during corneal wound contraction. J Cell Sci, v.104 (Pt 2), Feb, p.353-63. 1993.
- [128] Connolly, J. O., N. Simpson, *et al.* Rac regulates endothelial morphogenesis and capillary assembly. Mol Biol Cell, v.13, n.7, Jul, p.2474-85. 2002.
- [129] Debnath, J., K. R. Mills, *et al.* The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. Cell, v.111, n.1, Oct 4, p.29-40. 2002.
- [130] Simian, M., Y. Hirai, *et al.* The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. Development, v.128, n.16, Aug, p.3117-31. 2001.
- [131] Walpita, D. e E. Hay. Studying actin-dependent processes in tissue culture. Nat Rev Mol Cell Biol, v.3, n.2, Feb, p.137-41. 2002.
- [132] Kuntz, R. M. e W. M. Saltzman. Neutrophil motility in extracellular matrix gels: mesh size and adhesion affect speed of migration. Biophys J, v.72, n.3, Mar, p.1472-80. 1997.
- [133] Loike, J. D., L. Cao, *et al.* Blockade of alpha 5 beta 1 integrins reverses the inhibitory effect of tenascin on chemotaxis of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes through three-dimensional gels of extracellular matrix proteins. J Immunol, v.166, n.12, Jun 15, p.7534-42. 2001.
- [134] Friedl, P. e E. B. Brocker. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. Cell Mol Life Sci, v.57, n.1, Jan 20, p.41-64. 2000.
- [135] Bottaro, D. P., A. Liebmman-Vinson, *et al.* Molecular signaling in bioengineered tissue microenvironments. Ann N Y Acad Sci, v.961, Jun, p.143-53. 2002.
- [136] Chevally, B. e D. Herbage. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. Med Biol Eng Comput, v.38, n.2, Mar, p.211-8. 2000.

- [137] Wakatsuki, T., M. S. Kolodney, *et al.* Cell mechanics studied by a reconstituted model tissue. Bioophys J, v.79, n.5, Nov, p.2353-68. 2000.
- [138] Hocking, D. C., J. Sottile, *et al.* Stimulation of integrin-mediated cell contractility by fibronectin polymerization. J Biol Chem, v.275, n.14, Apr 7, p.10673-82. 2000.
- [139] Midwood, K. S., L. V. Valenick, *et al.* Coregulation of fibronectin signaling and matrix contraction by tenascin-C and syndecan-4. Mol Biol Cell, v.15, n.12, Dec, p.5670-7. 2004.
- [140] Yoshizato, K., M. Tsukahara, *et al.* The interaction of cellular fibronectin with collagen during fibroblast-mediated contraction of collagen gels. J Investig Dermatol Symp Proc, v.4, n.2, Sep, p.190-5. 1999.
- [141] Midwood, K. S. e J. E. Schwarzbauer. Tenascin-C modulates matrix contraction via focal adhesion kinase- and Rho-mediated signaling pathways. Mol Biol Cell, v.13, n.10, Oct, p.3601-13. 2002.
- [142] Sethi, K. K., I. V. Yannas, *et al.* Evidence for sequential utilization of fibronectin, vitronectin, and collagen during fibroblast-mediated collagen contraction. Wound Repair Regen, v.10, n.6, Nov-Dec, p.397-408. 2002.
- [143] Gullberg, D., A. Tingstrom, *et al.* Beta 1 integrin-mediated collagen gel contraction is stimulated by PDGF. Exp Cell Res, v.186, n.2, Feb, p.264-72. 1990.
- [144] Tomasek, J. J. e S. K. Akiyama. Fibroblast-mediated collagen gel contraction does not require fibronectin-alpha 5 beta 1 integrin interaction. Anat Rec, v.234, n.2, Oct, p.153-60. 1992.
- [145] Carver, W., I. Molano, *et al.* Role of the alpha 1 beta 1 integrin complex in collagen gel contraction in vitro by fibroblasts. J Cell Physiol, v.165, n.2, Nov, p.425-37. 1995.
- [146] Klein, C. E., D. Dressel, *et al.* Integrin alpha 2 beta 1 is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. J Cell Biol, v.115, n.5, Dec, p.1427-36. 1991.
- [147] Schiro, J. A., B. M. Chan, *et al.* Integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2) mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells. Cell, v.67, n.2, Oct 18, p.403-10. 1991.
- [148] Tiger, C. F., F. Fougousse, *et al.* alpha11beta1 integrin is a receptor for interstitial collagens involved in cell migration and collagen reorganization on mesenchymal nonmuscle cells. Dev Biol, v.237, n.1, Sep 1, p.116-29. 2001.
- [149] Cooke, M. E., T. Sakai, *et al.* Contraction of collagen matrices mediated by alpha2beta1A and alpha(v)beta3 integrins. J Cell Sci, v.113 (Pt 13), Jul, p.2375-83. 2000.
- [150] Mochitate, K., P. Pawelek, *et al.* Stress relaxation of contracted collagen gels: disruption of actin filament bundles, release of cell surface fibronectin, and down-regulation of DNA and protein synthesis. Exp Cell Res, v.193, n.1, Mar, p.198-207. 1991.
- [151] Dahlmann-Noor, A. H., B. Martin-Martin, *et al.* Dynamic protrusive cell behaviour generates force and drives early matrix contraction by fibroblasts. Exp Cell Res, v.313, n.20, Dec 10, p.4158-69. 2007.

- [152] Meshel, A. S., Q. Wei, *et al.* Basic mechanism of three-dimensional collagen fibre transport by fibroblasts. Nat Cell Biol, v.7, n.2, Feb, p.157-64. 2005.
- [153] Tamariz, E. e F. Grinnell. Modulation of fibroblast morphology and adhesion during collagen matrix remodeling. Mol Biol Cell, v.13, n.11, Nov, p.3915-29. 2002.
- [154] Yamato, M., E. Adachi, *et al.* Condensation of collagen fibrils to the direct vicinity of fibroblasts as a cause of gel contraction. J Biochem (Tokyo), v.117, n.5, May, p.940-6. 1995.
- [155] Guidry, C. e F. Grinnell. Heparin modulates the organization of hydrated collagen gels and inhibits gel contraction by fibroblasts. J Cell Biol, v.104, n.4, Apr, p.1097-103. 1987.
- [156] Ehrlich, H. P. e J. B. Rajaratnam. Cell locomotion forces versus cell contraction forces for collagen lattice contraction: an in vitro model of wound contraction. Tissue Cell, v.22, n.4, p.407-17. 1990.
- [157] Hirano, S., E. A. Shelden, *et al.* HSP27 regulates fibroblast adhesion, motility, and matrix contraction. Cell Stress Chaperones, v.9, n.1, Mar, p.29-37. 2004.
- [158] Iwabu, A., K. Smith, *et al.* Epidermal growth factor induces fibroblast contractility and motility via a protein kinase C delta-dependent pathway. J Biol Chem, v.279, n.15, Apr 9, p.14551-60. 2004.
- [159] Kanekar, S., T. K. Borg, *et al.* Modulation of heart fibroblast migration and collagen gel contraction by IGF-I. Cell Adhes Commun, v.7, n.6, p.513-23. 2000.
- [160] Micera, A., E. Vigneti, *et al.* Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.11, May 22, p.6162-7. 2001.
- [161] Sandulache, V. C., A. Parekh, *et al.* Prostaglandin E2 inhibition of keloid fibroblast migration, contraction, and transforming growth factor (TGF)-beta1-induced collagen synthesis. Wound Repair Regen, v.15, n.1, Jan-Feb, p.122-33. 2007.
- [162] Zhang, Z. G., I. Bothe, *et al.* Interactions of primary fibroblasts and keratinocytes with extracellular matrix proteins: contribution of alpha2beta1 integrin. J Cell Sci, v.119, n.Pt 9, May 1, p.1886-95. 2006.
- [163] Abe, M., C. H. Ho, *et al.* Different molecular motors mediate platelet-derived growth factor and lysophosphatidic acid-stimulated floating collagen matrix contraction. J Biol Chem, v.278, n.48, Nov 28, p.47707-12. 2003.
- [164] Skuta, G., C. H. Ho, *et al.* Increased myosin light chain phosphorylation is not required for growth factor stimulation of collagen matrix contraction. J Biol Chem, v.274, n.42, Oct 15, p.30163-8. 1999.
- [165] Abe, M., Y. Sogabe, *et al.* Evidence that PI3K, Rac, Rho, and Rho kinase are involved in basic fibroblast growth factor-stimulated fibroblast-Collagen matrix contraction. J Cell Biochem, v.102, n.5, Dec 1, p.1290-9. 2007.

- [166] Liu, S., S. W. Xu, *et al.* FAK is required for TGFbeta-induced JNK phosphorylation in fibroblasts: implications for acquisition of a matrix-remodeling phenotype. Mol Biol Cell, v.18, n.6, Jun, p.2169-78. 2007.
- [167] Finesmith, T. H., K. N. Broadley, *et al.* Fibroblasts from wounds of different stages of repair vary in their ability to contract a collagen gel in response to growth factors. J Cell Physiol, v.144, n.1, Jul, p.99-107. 1990.
- [168] Fukamizu, H. e F. Grinnell. Spatial organization of extracellular matrix and fibroblast activity: effects of serum, transforming growth factor beta, and fibronectin. Exp Cell Res, v.190, n.2, Oct, p.276-82. 1990.
- [169] Montesano, R. e L. Orci. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. Proc Natl Acad Sci U S A, v.85, n.13, Jul, p.4894-7. 1988.
- [170] Desmouliere, A., A. Geinoz, *et al.* Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. J Cell Biol, v.122, n.1, Jul, p.103-11. 1993.
- [171] Ronnov-Jessen, L. e O. W. Petersen. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. Lab Invest, v.68, n.6, Jun, p.696-707. 1993.
- [172] Tomasek, J. J., G. Gabbiani, *et al.* Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol, v.3, n.5, May, p.349-63. 2002.
- [173] Arora, P. D., N. Narani, *et al.* The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts. Am J Pathol, v.154, n.3, Mar, p.871-82. 1999.
- [174] Vaughan, M. B., E. W. Howard, *et al.* Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. Exp Cell Res, v.257, n.1, May 25, p.180-9. 2000.
- [175] Clark, R. A., J. M. Folkvord, *et al.* Platelet isoforms of platelet-derived growth factor stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. J Clin Invest, v.84, n.3, Sep, p.1036-40. 1989.
- [176] Tingstrom, A., C. H. Heldin, *et al.* Regulation of fibroblast-mediated collagen gel contraction by platelet-derived growth factor, interleukin-1 alpha and transforming growth factor-beta 1. J Cell Sci, v.102 (Pt 2), Jun, p.315-22. 1992.
- [177] Rayan, G. M., M. Parizi, *et al.* Pharmacologic regulation of Dupuytren's fibroblast contraction in vitro. J Hand Surg [Am], v.21, n.6, Nov, p.1065-70. 1996.
- [178] Smith, K. D., A. Wells, *et al.* Multiple signaling pathways mediate compaction of collagen matrices by EGF-stimulated fibroblasts. Exp Cell Res, v.312, n.11, Jul 1, p.1970-82. 2006.

- [179] Sakai, K., Y. Sumi, *et al.* Thrombospondin-1 promotes fibroblast-mediated collagen gel contraction caused by activation of latent transforming growth factor beta-1. J Dermatol Sci, v.31, n.2, Apr, p.99-109. 2003.
- [180] Lee, Y. R., Y. Oshita, *et al.* Combination of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-1 promotes fibroblast-embedded collagen gel contraction. Endocrinology, v.137, n.12, Dec, p.5278-83. 1996.
- [181] Dubertret, L., F. Brunner-Ferber, *et al.* Activities of human acidic fibroblast growth factor in an in vitro dermal equivalent model. J Invest Dermatol, v.97, n.5, Nov, p.793-8. 1991.
- [182] Irwin, C. R., T. Myrillas, *et al.* Regulation of fibroblast-induced collagen gel contraction by interleukin-1beta. J Oral Pathol Med, v.27, n.6, Jul, p.255-9. 1998.
- [183] Gillery, P., H. Serpier, *et al.* Gamma-interferon inhibits extracellular matrix synthesis and remodeling in collagen lattice cultures of normal and scleroderma skin fibroblasts. Eur J Cell Biol, v.57, n.2, Apr, p.244-53. 1992.
- [184] Berg, A., A. K. Ekwall, *et al.* Effect of PGE1, PGI2, and PGF2 alpha analogs on collagen gel compaction in vitro and interstitial pressure in vivo. Am J Physiol, v.274, n.2 Pt 2, Feb, p.H663-71. 1998.
- [185] Grinnell, F., C. H. Ho, *et al.* Differences in the regulation of fibroblast contraction of floating versus stressed collagen matrices. J Biol Chem, v.274, n.2, Jan 8, p.918-23. 1999.
- [186] Jiang, H., S. Rhee, *et al.* Distinguishing fibroblast promigratory and procontractile growth factor environments in 3D collagen matrices. Faseb J, In Press. 2008.
- [187] Bokoch, G. M. Biology of the p21-activated kinases. Annu Rev Biochem, v.72, p.743-81. 2003.
- [188] Jaffer, Z. M. e J. Chernoff. p21-activated kinases: three more join the Pak. Int J Biochem Cell Biol, v.34, n.7, Jul, p.713-7. 2002.
- [189] Parrini, M. C., M. Matsuda, *et al.* Spatiotemporal regulation of the Pak1 kinase. Biochem Soc Trans, v.33, n.Pt 4, Aug, p.646-8. 2005.
- [190] Ridley, A. J., M. A. Schwartz, *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. Science, v.302, n.5651, Dec 5, p.1704-9. 2003.
- [191] Webb, D. J., J. T. Parsons, *et al.* Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. Nat Cell Biol, v.4, n.4, Apr, p.E97-100. 2002.
- [192] Hotchin, N. A. e A. Hall. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. J Cell Biol, v.131, n.6 Pt 2, Dec, p.1857-65. 1995.
- [193] Ridley, A. J. e A. Hall. Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. Embo J, v.13, n.11, Jun 1, p.2600-10. 1994.

- [194] Chen, M., L. N. Towers, *et al.* LPA2 (EDG4) mediates Rho-dependent chemotaxis with lower efficacy than LPA1 (EDG2) in breast carcinoma cells. Am J Physiol Cell Physiol, v.292, n.5, May, p.C1927-33. 2007.
- [195] Sakai, T., J. M. De La Pena, *et al.* Synergism among lysophosphatidic acid, beta1A integrins, and epidermal growth factor or platelet-derived growth factor in mediation of cell migration. J Biol Chem, v.274, n.22, May 28, p.15480-6. 1999.
- [196] Lee, D. J., C. H. Ho, *et al.* LPA-stimulated fibroblast contraction of floating collagen matrices does not require Rho kinase activity or retraction of fibroblast extensions. Exp Cell Res, v.289, n.1, Sep 10, p.86-94. 2003.
- [197] Parizi, M., E. W. Howard, *et al.* Regulation of LPA-promoted myofibroblast contraction: role of Rho, myosin light chain kinase, and myosin light chain phosphatase. Exp Cell Res, v.254, n.2, Feb 1, p.210-20. 2000.
- [198] Yanase, M., H. Ikeda, *et al.* Lysophosphatidic acid enhances collagen gel contraction by hepatic stellate cells: association with rho-kinase. Biochem Biophys Res Commun, v.277, n.1, Oct 14, p.72-8. 2000.
- [199] Shreiber, D. I., P. A. Enever, *et al.* Effects of pdgf-bb on rat dermal fibroblast behavior in mechanically stressed and unstressed collagen and fibrin gels. Exp Cell Res, v.266, n.1, May 15, p.155-66. 2001.
- [200] Grinnell, F., L. B. Rocha, *et al.* Nested collagen matrices: a new model to study migration of human fibroblast populations in three dimensions. Exp Cell Res, v.312, n.1, Jan 1, p.86-94. 2006.
- [201] Delvoye, P., P. Wiliquet, *et al.* Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel. J Invest Dermatol, v.97, n.5, Nov, p.898-902. 1991.
- [202] Kasugai, S., S. Suzuki, *et al.* Measurements of the isometric contractile forces generated by dog periodontal ligament fibroblasts in vitro. Arch Oral Biol, v.35, n.8, p.597-601. 1990.
- [203] Kolodney, M. S. e R. B. Wysolmerski. Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study. J Cell Biol, v.117, n.1, Apr, p.73-82. 1992.
- [204] Grinnell, F., C. H. Ho, *et al.* Dendritic fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. Mol Biol Cell, v.14, n.2, Feb, p.384-95. 2003.
- [205] Dickson, B. J. Rho GTPases in growth cone guidance. Curr Opin Neurobiol, v.11, n.1, Feb, p.103-10. 2001.
- [206] Luo, L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. Nat Rev Neurosci, v.1, n.3, Dec, p.173-80. 2000.
- [207] Stopak, D. e A. K. Harris. Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. I. Tissue culture observations. Dev Biol, v.90, n.2, Apr, p.383-98. 1982.

- [208] Farsi, J. M. e J. E. Aubin. Microfilament rearrangements during fibroblast-induced contraction of three-dimensional hydrated collagen gels. Cell Motil, v.4, n.1, p.29-40. 1984.
- [209] Tomasek, J. J., C. J. Haaksma, *et al.* Fibroblast contraction occurs on release of tension in attached collagen lattices: dependency on an organized actin cytoskeleton and serum. Anat Rec, v.232, n.3, Mar, p.359-68. 1992.
- [210] Kono, T., T. Tanii, *et al.* Cell cycle analysis of human dermal fibroblasts cultured on or in hydrated type I collagen lattices. Arch Dermatol Res, v.282, n.4, p.258-62. 1990.
- [211] Nishiyama, T., M. Tsunenaga, *et al.* Growth rate of human fibroblasts is repressed by the culture within reconstituted collagen matrix but not by the culture on the matrix. Matrix, v.9, n.3, Jun, p.193-9. 1989.
- [212] Sarber, R., B. Hull, *et al.* Regulation of proliferation of fibroblasts of low and high population doubling levels grown in collagen lattices. Mech Ageing Dev, v.17, n.2, Oct, p.107-17. 1981.
- [213] Nishiyama, T., N. Akutsu, *et al.* Response to growth factors of human dermal fibroblasts in a quiescent state owing to cell-matrix contact inhibition. Matrix, v.11, n.2, Apr, p.71-5. 1991.
- [214] Nishiyama, T., I. Horii, *et al.* A distinct characteristic of the quiescent state of human dermal fibroblasts in contracted collagen gel as revealed by no response to epidermal growth factor alone, but a positive growth response to a combination of the growth factor and saikosaponin b1. Matrix, v.10, n.6, Dec, p.412-9. 1990.
- [215] Lin, Y. C. e F. Grinnell. Decreased level of PDGF-stimulated receptor autophosphorylation by fibroblasts in mechanically relaxed collagen matrices. J Cell Biol, v.122, n.3, Aug, p.663-72. 1993.
- [216] Jain, M. K., R. A. Berg, *et al.* Mechanical stress and cellular metabolism in living soft tissue composites. Biomaterials, v.11, n.7, Sep, p.465-72. 1990.
- [217] Nusgens, B., C. Merrill, *et al.* Collagen biosynthesis by cells in a tissue equivalent matrix in vitro. Coll Relat Res, v.4, n.5, Oct, p.351-63. 1984.
- [218] Unemori, E. N. e Z. Werb. Reorganization of polymerized actin: a possible trigger for induction of procollagenase in fibroblasts cultured in and on collagen gels. J Cell Biol, v.103, n.3, Sep, p.1021-31. 1986.
- [219] Paye, M., B. V. Nusgens, *et al.* Modulation of cellular biosynthetic activity in the retracting collagen lattice. Eur J Cell Biol, v.45, n.1, Dec, p.44-50. 1987.
- [220] Eckes, B., C. Mauch, *et al.* Downregulation of collagen synthesis in fibroblasts within three-dimensional collagen lattices involves transcriptional and posttranscriptional mechanisms. FEBS Lett, v.318, n.2, Mar 1, p.129-33. 1993.
- [221] Lambert, C. A., E. P. Soudant, *et al.* Pretranslational regulation of extracellular matrix macromolecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces. Lab Invest, v.66, n.4, Apr, p.444-51. 1992.

- [222] Mauch, C., A. Hatamochi, *et al.* Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel. Exp Cell Res, v.178, n.2, Oct, p.493-503. 1988.
- [223] Lee, T. L., Y. C. Lin, *et al.* Stress-relaxation of fibroblasts in collagen matrices triggers ectocytosis of plasma membrane vesicles containing actin, annexins II and VI, and beta 1 integrin receptors. J Cell Sci, v.105 (Pt 1), May, p.167-77. 1993.
- [224] He, Y. e F. Grinnell. Stress relaxation of fibroblasts activates a cyclic AMP signaling pathway. J Cell Biol, v.126, n.2, Jul, p.457-64. 1994.
- [225] _____. Role of phospholipase D in the cAMP signal transduction pathway activated during fibroblast contraction of collagen matrices. J Cell Biol, v.130, n.5, Sep, p.1197-205. 1995.
- [226] Iwig, M., D. Glaesser, *et al.* Cell shape-mediated growth control of lens epithelial cells grown in culture. Exp Cell Res, v.131, n.1, Jan, p.47-55. 1981.
- [227] Arem, A. J. e J. W. Madden. Effects of stress on healing wounds: I. Intermittent noncyclical tension. J Surg Res, v.20, n.2, Feb, p.93-102. 1976.
- [228] Burgess, L. P., G. V. Morin, *et al.* Wound healing. Relationship of wound closing tension to scar width in rats. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, v.116, n.7, Jul, p.798-802. 1990.
- [229] Larson, D. L., S. Abston, *et al.* Techniques for decreasing scar formation and contractures in the burned patient. J Trauma, v.11, n.10, Oct, p.807-23. 1971.
- [230] Rockwell, W. B., I. K. Cohen, *et al.* Keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review. Plast Reconstr Surg, v.84, n.5, Nov, p.827-37. 1989.
- [231] Abercrombie, M. e G. A. Dunn. Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. Exp Cell Res, v.92, n.1, Apr, p.57-62. 1975.
- [232] Izzard, C. S. e L. R. Lochner. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. J Cell Sci, v.21, n.1, Jun, p.129-59. 1976.
- [233] Arnold, M., E. A. Cavalcanti-Adam, *et al.* Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. Chemphyschem, v.5, n.3, Mar 19, p.383-8. 2004.
- [234] Cavalcanti-Adam, E. A., A. Micoulet, *et al.* Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly. Eur J Cell Biol, v.85, n.3-4, Apr, p.219-24. 2006.
- [235] Frey, M. T., I. Y. Tsai, *et al.* Cellular responses to substrate topography: role of myosin II and focal adhesion kinase. Biophys J, v.90, n.10, May 15, p.3774-82. 2006.
- [236] They, M., A. Pepin, *et al.* Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. Cell Motil Cytoskeleton, v.63, n.6, Jun, p.341-55. 2006.
- [237] Guo, W. H., M. T. Frey, *et al.* Substrate rigidity regulates the formation and maintenance of tissues. Biophys J, v.90, n.6, Mar 15, p.2213-20. 2006.

- [238] Kostic, A. e M. P. Sheetz. Fibronectin rigidity response through Fyn and p130Cas recruitment to the leading edge. Mol Biol Cell, v.17, n.6, Jun, p.2684-95. 2006.
- [239] Tamada, M., M. P. Sheetz, *et al.* Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. Dev Cell, v.7, n.5, Nov, p.709-18. 2004.
- [240] Zaidel-Bar, R., Z. Kam, *et al.* Polarized downregulation of the paxillin-p130CAS-Rac1 pathway induced by shear flow. J Cell Sci, v.118, n.Pt 17, Sep 1, p.3997-4007. 2005.
- [241] Yamada, K. M., R. Pankov, *et al.* Dimensions and dynamics in integrin function. Braz J Med Biol Res, v.36, n.8, Aug, p.959-66. 2003.
- [242] Beningo, K. A., M. Dembo, *et al.* Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. J Cell Biol, v.153, n.4, May 14, p.881-8. 2001.
- [243] Zaidel-Bar, R., C. Ballestrem, *et al.* Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. J Cell Sci, v.116, n.Pt 22, Nov 15, p.4605-13. 2003.
- [244] Ballestrem, C., B. Hinz, *et al.* Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. J Cell Biol, v.155, n.7, Dec 24, p.1319-32. 2001.
- [245] Munevar, S., Y. L. Wang, *et al.* Distinct roles of frontal and rear cell-substrate adhesions in fibroblast migration. Mol Biol Cell, v.12, n.12, Dec, p.3947-54. 2001.
- [246] Rottner, K., A. Hall, *et al.* Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. Curr Biol, v.9, n.12, Jun 17, p.640-8. 1999.
- [247] Amano, M., K. Chihara, *et al.* Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. Science, v.275, n.5304, Feb 28, p.1308-11. 1997.
- [248] Maekawa, M., T. Ishizaki, *et al.* Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. Science, v.285, n.5429, Aug 6, p.895-8. 1999.
- [249] Ridley, A. J. e A. Hall. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell, v.70, n.3, Aug 7, p.389-99. 1992.
- [250] Pankov, R., E. Cukierman, *et al.* Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. J Cell Biol, v.148, n.5, Mar 6, p.1075-90. 2000.
- [251] Adelmann-Grill, B. C., F. Wach, *et al.* Chemotactic migration of normal dermal fibroblasts towards epidermal growth factor and its modulation by platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. Eur J Cell Biol, v.51, n.2, Apr, p.322-6. 1990.
- [252] Kondo, H., R. Matsuda, *et al.* Autonomous migration of human fetal skin fibroblasts into a denuded area in a cell monolayer is mediated by basic fibroblast growth factor and collagen. In Vitro Cell Dev Biol Anim, v.29A, n.12, Dec, p.929-35. 1993.

- [253] Seppa, H., G. Grotendorst, *et al.* Platelet-derived growth factor in chemotactic for fibroblasts. J Cell Biol, v.92, n.2, Feb, p.584-8. 1982.
- [254] Kondo, H., R. Matsuda, *et al.* Platelet-derived growth factor in combination with collagen promotes the migration of human skin fibroblasts into a denuded area of a cell monolayer. Exp Cell Res, v.202, n.1, Sep, p.45-51. 1992.
- [255] Postlethwaite, A. E., J. Keski-Oja, *et al.* Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. J Exp Med, v.165, n.1, Jan 1, p.251-6. 1987.
- [256] Ellis, I., A. M. Grey, *et al.* Antagonistic effects of TGF-beta 1 and MSF on fibroblast migration and hyaluronic acid synthesis. Possible implications for dermal wound healing. J Cell Sci, v.102 (Pt 3), Jul, p.447-56. 1992.
- [257] Stoker, M. e E. Gherardi. Regulation of cell movement: the motogenic cytokines. Biochim Biophys Acta, v.1072, n.1, Apr 16, p.81-102. 1991.
- [258] Senior, R. M., S. S. Huang, *et al.* Brain-derived growth factor is a chemoattractant for fibroblasts and astroglial cells. Biochem Biophys Res Commun, v.141, n.1, Nov 26, p.67-72. 1986.
- [259] Schreier, T., E. Degen, *et al.* Fibroblast migration and proliferation during in vitro wound healing. A quantitative comparison between various growth factors and a low molecular weight blood dialysate used in the clinic to normalize impaired wound healing. Res Exp Med (Berl), v.193, n.4, p.195-205. 1993.
- [260] Buckley-Sturrock, A., S. C. Woodward, *et al.* Differential stimulation of collagenase and chemotactic activity in fibroblasts derived from rat wound repair tissue and human skin by growth factors. J Cell Physiol, v.138, n.1, Jan, p.70-8. 1989.
- [261] Ellis, I., J. Banyard, *et al.* Differential response of fetal and adult fibroblasts to cytokines: cell migration and hyaluronan synthesis. Development, v.124, n.8, Apr, p.1593-600. 1997.
- [262] Heldin, C. H. e B. Westermark. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. Physiol Rev, v.79, n.4, Oct, p.1283-316. 1999.
- [263] Blatti, S. P., D. N. Foster, *et al.* Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.85, n.4, Feb, p.1119-23. 1988.
- [264] Lepisto, J., J. Peltonen, *et al.* Selective modulation of collagen gene expression by different isoforms of platelet-derived growth factor in experimental wound healing. Cell Tissue Res, v.286, n.3, Dec, p.449-55. 1996.
- [265] Heldin, P., T. C. Laurent, *et al.* Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. Biochem J, v.258, n.3, Mar 15, p.919-22. 1989.
- [266] Bauer, E. A., T. W. Cooper, *et al.* Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.82, n.12, Jun, p.4132-6. 1985.

- [267] Grotendorst, G. R., G. R. Martin, *et al.* Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats. J Clin Invest, v.76, n.6, Dec, p.2323-9. 1985.
- [268] Sprugel, K. H., J. M. Mcpherson, *et al.* Effects of growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chambers. Am J Pathol, v.129, n.3, Dec, p.601-13. 1987.
- [269] Pierce, G. F., J. E. Tarpley, *et al.* Tissue repair processes in healing chronic pressure ulcers treated with recombinant platelet-derived growth factor BB. Am J Pathol, v.145, n.6, Dec, p.1399-410. 1994.
- [270] Li, W., J. Fan, *et al.* Mechanism of human dermal fibroblast migration driven by type I collagen and platelet-derived growth factor-BB. Mol Biol Cell, v.15, n.1, Jan, p.294-309. 2004.
- [271] Xu, J., M. M. Zutter, *et al.* PDGF induction of alpha 2 integrin gene expression is mediated by protein kinase C-zeta. J Cell Biol, v.134, n.5, Sep, p.1301-11. 1996.
- [272] Bade, E. G. e B. Nitzgen. Extracellular matrix (ECM) modulates the EGF-induced migration of liver epithelial cells in serum-free, hormone-supplemented medium. In Vitro Cell Dev Biol, v.21, n.4, Apr, p.245-8. 1985.
- [273] Schor, S. L. Cytokine control of cell motility: modulation and mediation by the extracellular matrix. Prog Growth Factor Res, v.5, n.2, p.223-48. 1994.
- [274] Zubiaur, M., J. Sancho, *et al.* A small GTP-binding protein, Rho, associates with the platelet-derived growth factor type-beta receptor upon ligand binding. J Biol Chem, v.270, n.29, Jul 21, p.17221-8. 1995.
- [275] Kozma, R., S. Ahmed, *et al.* The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. Mol Cell Biol, v.15, n.4, Apr, p.1942-52. 1995.
- [276] Nobes, C. D. e A. Hall. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. Cell, v.81, n.1, Apr 7, p.53-62. 1995.
- [277] Sander, E. E., J. P. Ten Klooster, *et al.* Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. J Cell Biol, v.147, n.5, Nov 29, p.1009-22. 1999.
- [278] Tomasek, J. J., E. D. Hay, *et al.* Collagen modulates cell shape and cytoskeleton of embryonic corneal and fibroma fibroblasts: distribution of actin, alpha-actinin, and myosin. Dev Biol, v.92, n.1, Jul, p.107-22. 1982.
- [279] Small, J. V., T. Stradal, *et al.* The lamellipodium: where motility begins. Trends Cell Biol, v.12, n.3, Mar, p.112-20. 2002.
- [280] Borisy, G. G. e T. M. Svitkina. Actin machinery: pushing the envelope. Curr Opin Cell Biol, v.12, n.1, Feb, p.104-12. 2000.

- [281] Kaverina, I., O. Krylyshkina, *et al.* Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. Int J Biochem Cell Biol, v.34, n.7, Jul, p.746-61. 2002.
- [282] Grzesiak, J. J., G. E. Davis, *et al.* Regulation of alpha 2 beta 1-mediated fibroblast migration on type I collagen by shifts in the concentrations of extracellular Mg²⁺ and Ca²⁺. J Cell Biol, v.117, n.5, Jun, p.1109-17. 1992.
- [283] Sawhney, R. K. e J. Howard. Slow local movements of collagen fibers by fibroblasts drive the rapid global self-organization of collagen gels. J Cell Biol, v.157, n.6, Jun 10, p.1083-91. 2002.
- [284] Tucker, R. P., B. F. Edwards, *et al.* Tension in the culture dish: microfilament organization and migratory behavior of quail neural crest cells. Cell Motil, v.5, n.3, p.225-37. 1985.
- [285] Clark, R. A., J. Q. An, *et al.* Fibroblast migration on fibronectin requires three distinct functional domains. J Invest Dermatol, v.121, n.4, Oct, p.695-705. 2003.
- [286] Greiling, D. e R. A. Clark. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. J Cell Sci, v.110 (Pt 7), Apr, p.861-70. 1997.
- [287] Helary, C., A. Foucault-Bertaud, *et al.* Fibroblast populated dense collagen matrices: cell migration, cell density and metalloproteinases expression. Biomaterials, v.26, n.13, May, p.1533-43. 2005.
- [288] Sabeh, F., I. Ota, *et al.* Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. J Cell Biol, v.167, n.4, Nov 22, p.769-81. 2004.
- [289] Schor, S. L. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro. J Cell Sci, v.41, Feb, p.159-75. 1980.
- [290] Ivaska, J. e J. Heino. Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. Cell Mol Life Sci, v.57, n.1, Jan 20, p.16-24. 2000.
- [291] Miron-Mendoza, M., J. Seemann, *et al.* Collagen fibril flow and tissue translocation coupled to fibroblast migration in 3D collagen matrices. Mol Biol Cell, In Press. 2008.
- [292] Maaser, K., K. Wolf, *et al.* Functional hierarchy of simultaneously expressed adhesion receptors: integrin alpha2beta1 but not CD44 mediates MV3 melanoma cell migration and matrix reorganization within three-dimensional hyaluronan-containing collagen matrices. Mol Biol Cell, v.10, n.10, Oct, p.3067-79. 1999.
- [293] Mayer, C., K. Maaser, *et al.* Release of cell fragments by invading melanoma cells. Eur J Cell Biol, v.83, n.11-12, Dec, p.709-15. 2004.
- [294] Yamada, K. M., D. W. Kennedy, *et al.* Monoclonal antibody and synthetic peptide inhibitors of human tumor cell migration. Cancer Res, v.50, n.15, Aug 1, p.4485-96. 1990.

- [295] Heath, J. P. e L. D. Peachey. Morphology of fibroblasts in collagen gels: a study using 400 keV electron microscopy and computer graphics. Cell Motil Cytoskeleton, v.14, n.3, p.382-92. 1989.
- [296] Huttenlocher, A., R. R. Sandborg, *et al.* Adhesion in cell migration. Curr Opin Cell Biol, v.7, n.5, Oct, p.697-706. 1995.
- [297] Friedl, P., K. S. Zanker, *et al.* Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. Microsc Res Tech, v.43, n.5, Dec 1, p.369-78. 1998.
- [298] Doane, K. J. e D. E. Birk. Fibroblasts retain their tissue phenotype when grown in three-dimensional collagen gels. Exp Cell Res, v.195, n.2, Aug, p.432-42. 1991.
- [299] Cukierman, E., R. Pankov, *et al.* Cell interactions with three-dimensional matrices. Curr Opin Cell Biol, v.14, n.5, Oct, p.633-9. 2002.
- [300] Miyamoto, S., H. Teramoto, *et al.* Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. J Cell Biol, v.131, n.3, Nov, p.791-805. 1995.
- [301] Brakebusch, C., E. Hirsch, *et al.* Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. J Cell Sci, v.110 (Pt 23), Dec, p.2895-904. 1997.
- [302] Akiyama, S. K., S. S. Yamada, *et al.* Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. J Cell Biol, v.109, n.2, Aug, p.863-75. 1989.
- [303] Grinnell, F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. J Cell Biol, v.124, n.4, Feb, p.401-4. 1994.
- [304] Banyard, J., B. Anand-Apte, *et al.* Motility and invasion are differentially modulated by Rho family GTPases. Oncogene, v.19, n.4, Jan 27, p.580-91. 2000.
- [305] Moorman, J. P., D. Luu, *et al.* A balance of signaling by Rho family small GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42 coordinates cytoskeletal morphology but not cell survival. Oncogene, v.18, n.1, Jan 7, p.47-57. 1999.
- [306] Schor, S. L., A. M. Schor, *et al.* The use of three-dimensional collagen gels for the study of tumour cell invasion in vitro: experimental parameters influencing cell migration into the gel matrix. Int J Cancer, v.29, n.1, Jan 15, p.57-62. 1982.
- [307] Schor, S. L. e J. Court. Different mechanisms in the attachment of cells to native and denatured collagen. J Cell Sci, v.38, Aug, p.267-81. 1979.
- [308] Decker, C., R. Greggs, *et al.* Adhesive multiplicity in the interaction of embryonic fibroblasts and myoblasts with extracellular matrices. J Cell Biol, v.99, n.4 Pt 1, Oct, p.1398-404. 1984.
- [309] Elenstrom-Magnusson, C., W. Chen, *et al.* IL-4-induced B cell migration involves transient interactions between beta 1 integrins and extracellular matrix components. Int Immunol, v.7, n.4, Apr, p.567-73. 1995.

- [310] Sundqvist, K. G., D. Hauzenberger, *et al.* T lymphocyte infiltration of two- and three-dimensional collagen substrata by an adhesive mechanism. Exp Cell Res, v.206, n.1, May, p.100-10. 1993.
- [311] Werr, J., X. Xie, *et al.* beta1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue In vivo. J Exp Med, v.187, n.12, Jun 15, p.2091-6. 1998.
- [312] Friedl, P., E. B. Brocker, *et al.* Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocytes and tumor cells. Cell Adhes Commun, v.6, n.2-3, p.225-36. 1998.
- [313] Mandeville, J. T., M. A. Lawson, *et al.* Dynamic imaging of neutrophil migration in three dimensions: mechanical interactions between cells and matrix. J Leukoc Biol, v.61, n.2, Feb, p.188-200. 1997.
- [314] Gunzer, M., E. Kampgen, *et al.* Migration of dendritic cells in 3D-collagen lattices. Visualisation of dynamic interactions with the substratum and the distribution of surface structures via a novel confocal reflection imaging technique. Adv Exp Med Biol, v.417, p.97-103. 1997.
- [315] Hiraoka, N., E. Allen, *et al.* Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. Cell, v.95, n.3, Oct 30, p.365-77. 1998.
- [316] Tuan, T. L. e F. Grinnell. Fibronectin and fibrinolysis are not required for fibrin gel contraction by human skin fibroblasts. J Cell Physiol, v.140, n.3, Sep, p.577-83. 1989.
- [317] Sahai, E. e C. J. Marshall. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. Nat Cell Biol, v.5, n.8, Aug, p.711-9. 2003.
- [318] Friedl, P. e K. Wolf. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nat Rev Cancer, v.3, n.5, May, p.362-74. 2003.
- [319] Zaman, M. H., L. M. Trapani, *et al.* Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.29, Jul 18, p.10889-94. 2006.
- [320] Birchmeier, W., J. Hulsken, *et al.* Adherens junction proteins in tumour progression. Cancer Surv, v.24, p.129-40. 1995.
- [321] Enterline, H. T. e D. R. Coman. The ameboid motility of human and animal neoplastic cells. Cancer, v.3, n.6, Nov, p.1033-8. 1950.
- [322] Weaver, V. M., O. W. Petersen, *et al.* Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. J Cell Biol, v.137, n.1, Apr 7, p.231-45. 1997.
- [323] Abercrombie, M. Contact inhibition and malignancy. Nature, v.281, n.5729, Sep 27, p.259-62. 1979.

- [324] Lee, J. M., S. Dedhar, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. J Cell Biol, v.172, n.7, Mar 27, p.973-81. 2006.
- [325] Itoh, K., K. Yoshioka, *et al.* An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. Nat Med, v.5, n.2, Feb, p.221-5. 1999.
- [326] Kaneko, K., K. Satoh, *et al.* Myosin light chain kinase inhibitors can block invasion and adhesion of human pancreatic cancer cell lines. Pancreas, v.24, n.1, Jan, p.34-41. 2002.
- [327] D'ortho, M. P., H. Stanton, *et al.* MT1-MMP on the cell surface causes focal degradation of gelatin films. FEBS Lett, v.421, n.2, Jan 9, p.159-64. 1998.
- [328] Sameni, M., J. Dosesco, *et al.* Imaging proteolysis by living human glioma cells. Biol Chem, v.382, n.5, May, p.785-8. 2001.
- [329] Munevar, S., Y. Wang, *et al.* Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. Biophys J, v.80, n.4, Apr, p.1744-57. 2001.
- [330] Fox, P. L., G. Sa, *et al.* The regulation of endothelial cell motility by p21 ras. Oncogene, v.9, n.12, Dec, p.3519-26. 1994.
- [331] Liu, R., B. Li, *et al.* Elevated superoxide production by active H-ras enhances human lung WI-38VA-13 cell proliferation, migration and resistance to TNF-alpha. Oncogene, v.20, n.12, Mar 22, p.1486-96. 2001.
- [332] Ridley, A. J., P. M. Comoglio, *et al.* Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. Mol Cell Biol, v.15, n.2, Feb, p.1110-22. 1995.
- [333] Shin, I., S. Kim, *et al.* H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells. J Biol Chem, v.280, n.15, Apr 15, p.14675-83. 2005.
- [334] Schor, S. L., A. M. Schor, *et al.* Adult, foetal and transformed fibroblasts display different migratory phenotypes on collagen gels: evidence for an isoformic transition during foetal development. J Cell Sci, v.73, Feb, p.221-34. 1985.
- [335] Gadea, G., M. De Toledo, *et al.* Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. J Cell Biol, v.178, n.1, Jul 2, p.23-30. 2007.
- [336] Demou, Z. N. e L. V. Mcintire. Fully automated three-dimensional tracking of cancer cells in collagen gels: determination of motility phenotypes at the cellular level. Cancer Res, v.62, n.18, Sep 15, p.5301-7. 2002.
- [337] Farina, K. L., J. B. Wyckoff, *et al.* Cell motility of tumor cells visualized in living intact primary tumors using green fluorescent protein. Cancer Res, v.58, n.12, Jun 15, p.2528-32. 1998.
- [338] Hahn, W. C., C. M. Counter, *et al.* Creation of human tumour cells with defined genetic elements. Nature, v.400, n.6743, Jul 29, p.464-8. 1999.

- [339] Hahn, W. C., S. K. Dessain, *et al.* Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. Mol Cell Biol, v.22, n.7, Apr, p.2111-23. 2002.
- [340] Schinzel, A. C. e W. C. Hahn. Oncogenic transformation and experimental models of human cancer. Front Biosci, v.13, p.71-84. 2008.
- [341] Boehm, J. S. e W. C. Hahn. Cancer genetics: Finding the right mix. Eur J Hum Genet, v.13, n.10, Oct, p.1099-100. 2005.
- [342] Halbert, C. L., G. W. Demers, *et al.* The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. J Virol, v.66, n.4, Apr, p.2125-34. 1992.
- [343] Clark, G. J., A. D. Cox, *et al.* Biological assays for Ras transformation. Methods Enzymol, v.255, p.395-412. 1995.
- [344] Narisawa-Saito, M. e T. Kiyono. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. Cancer Sci, v.98, n.10, Oct, p.1505-11. 2007.
- [345] Hicks, G. G., S. E. Egan, *et al.* Mutant p53 tumor suppressor alleles release ras-induced cell cycle growth arrest. Mol Cell Biol, v.11, n.3, Mar, p.1344-52. 1991.
- [346] Serrano, M., A. W. Lin, *et al.* Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. Cell, v.88, n.5, Mar 7, p.593-602. 1997.
- [347] Hurlin, P. J., D. G. Fry, *et al.* Morphological transformation, focus formation, and anchorage independence induced in diploid human fibroblasts by expression of a transfected H-ras oncogene. Cancer Res, v.47, n.21, Nov 1, p.5752-7. 1987.
- [348] Maher, J., D. A. Baker, *et al.* Evidence for cell-specific differences in transformation by N-, H- and K-ras. Oncogene, v.11, n.8, Oct 19, p.1639-47. 1995.
- [349] Borek, C. e L. Sachs. The Difference in Contact Inhibition of Cell Replication between Normal Cells and Cells Transformed by Different Carcinogens. Proc Natl Acad Sci U S A, v.56, n.6, Dec, p.1705-1711. 1966.
- [350] Agiostratidou, G., J. Hult, *et al.* Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. J Mammary Gland Biol Neoplasia, v.12, n.2-3, Sep, p.127-33. 2007.
- [351] De Wever, O. e M. Mareel. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. J Pathol, v.200, n.4, Jul, p.429-47. 2003.
- [352] Desmouliere, A., C. Guyot, *et al.* The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. Int J Dev Biol, v.48, n.5-6, p.509-17. 2004.
- [353] Kunz-Schughart, L. A. e R. Knuechel. Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? Histol Histopathol, v.17, n.2, Apr, p.599-621. 2002.

- [354] Silzle, T., G. J. Randolph, *et al.* The fibroblast: sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue. Int J Cancer, v.108, n.2, Jan 10, p.173-80. 2004.
- [355] Orimo, A. e R. A. Weinberg. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. Cell Cycle, v.5, n.15, Aug, p.1597-601. 2006.
- [356] Millward, T. A., S. Zolnierowicz, *et al.* Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. Trends Biochem Sci, v.24, n.5, May, p.186-91. 1999.
- [357] Kjoller, L. e A. Hall. Signaling to Rho GTPases. Exp Cell Res, v.253, n.1, Nov 25, p.166-79. 1999.
- [358] Rajalingam, K., R. Schreck, *et al.* Ras oncogenes and their downstream targets. Biochim Biophys Acta, v.1773, n.8, Aug, p.1177-95. 2007.
- [359] Bar-Sagi, D. e J. R. Feramisco. Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. Science, v.233, n.4768, Sep 5, p.1061-8. 1986.
- [360] Joneson, T., M. A. White, *et al.* Stimulation of membrane ruffling and MAP kinase activation by distinct effectors of RAS. Science, v.271, n.5250, Feb 9, p.810-2. 1996.
- [361] Ingebritsen, T. S. e P. Cohen. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. Science, v.221, n.4608, Jul 22, p.331-8. 1983.
- [362] Medina, A., P. G. Scott, *et al.* Pathophysiology of chronic nonhealing wounds. J Burn Care Rehabil, v.26, n.4, Jul-Aug, p.306-19. 2005.
- [363] Mendez, M. V., A. Stanley, *et al.* Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. J Vasc Surg, v.28, n.5, Nov, p.876-83. 1998.
- [364] Stanley, A. e T. Osler. Senescence and the healing rates of venous ulcers. J Vasc Surg, v.33, n.6, Jun, p.1206-11. 2001.
- [365] Margolis, D. J., C. Bartus, *et al.* Effectiveness of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. Wound Repair Regen, v.13, n.6, Nov-Dec, p.531-6. 2005.
- [366] Niezgodá, J. A., C. C. Van Gils, *et al.* Randomized clinical trial comparing OASIS Wound Matrix to Regranex Gel for diabetic ulcers. Adv Skin Wound Care, v.18, n.5 Pt 1, Jun, p.258-66. 2005.
- [367] Steed, D. L. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity ulcers. Plast Reconstr Surg, v.117, n.7 Suppl, Jun, p.143S-149S; discussion 150S-151S. 2006.
- [368] Meloche, S. e J. Pouyssegur. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. Oncogene, v.26, n.22, May 14, p.3227-39. 2007.

- [369] Fringer, J. e F. Grinnell. Fibroblast quiescence in floating or released collagen matrices: contribution of the ERK signaling pathway and actin cytoskeletal organization. J Biol Chem, v.276, n.33, Aug 17, p.31047-52. 2001.
- [370] _____. Fibroblast quiescence in floating collagen matrices: decrease in serum activation of MEK and Raf but not Ras. J Biol Chem, v.278, n.23, Jun 6, p.20612-7. 2003.
- [371] Rosenfeldt, H. e F. Grinnell. Fibroblast quiescence and the disruption of ERK signaling in mechanically unloaded collagen matrices. J Biol Chem, v.275, n.5, Feb 4, p.3088-92. 2000.
- [372] Fisher, K. E., A. Pop, *et al.* Tumor cell invasion of collagen matrices requires coordinate lipid agonist-induced G-protein and membrane-type matrix metalloproteinase-1-dependent signaling. Mol Cancer, v.5, p.69. 2006.
- [373] Schmitz, A. A., E. E. Govek, *et al.* Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. Exp Cell Res, v.261, n.1, Nov 25, p.1-12. 2000.
- [374] Fredriksson, L., H. Li, *et al.* The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. Cytokine Growth Factor Rev, v.15, n.4, Aug, p.197-204. 2004.
- [375] Sanchez, T. e T. Hla. Structural and functional characteristics of S1P receptors. J Cell Biochem, v.92, n.5, Aug 1, p.913-22. 2004.
- [376] Sengupta, S., Z. Wang, *et al.* Biology of LPA in health and disease. Semin Cell Dev Biol, v.15, n.5, Oct, p.503-12. 2004.
- [377] Yatomi, Y., Y. Igarashi, *et al.* Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. J Biochem, v.121, n.5, May, p.969-73. 1997.
- [378] Gao, Z., T. Sasaoka, *et al.* Deletion of the PDGFR-beta gene affects key fibroblast functions important for wound healing. J Biol Chem, v.280, n.10, Mar 11, p.9375-89. 2005.
- [379] Javelaud, D., J. Laboureau, *et al.* Disruption of basal JNK activity differentially affects key fibroblast functions important for wound healing. J Biol Chem, v.278, n.27, Jul 4, p.24624-8. 2003.
- [380] Derijard, B., M. Hibi, *et al.* JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. Cell, v.76, n.6, Mar 25, p.1025-37. 1994.
- [381] Smeal, T., B. Binetruy, *et al.* Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. Nature, v.354, n.6353, Dec 12, p.494-6. 1991.
- [382] Schutte, J., J. D. Minna, *et al.* Deregulated expression of human c-jun transforms primary rat embryo cells in cooperation with an activated c-Ha-ras gene and transforms rat-1a cells as a single gene. Proc Natl Acad Sci U S A, v.86, n.7, Apr, p.2257-61. 1989.
- [383] Minden, A., A. Lin, *et al.* Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. Science, v.266, n.5191, Dec 9, p.1719-23. 1994.

- [384] Giehl, K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. Biol Chem, v.386, n.3, Mar, p.193-205. 2005.
- [385] Newman, S. A., D. A. Frenz, *et al.* Matrix-driven translocation of cells and nonliving particles. Science, v.228, n.4701, May 17, p.885-9. 1985.
- [386] Lo, C. M., H. B. Wang, *et al.* Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. Biophys J, v.79, n.1, Jul, p.144-52. 2000.
- [387] Tzvetkova-Chevolleau, T., A. Stephanou, *et al.* The motility of normal and cancer cells in response to the combined influence of the substrate rigidity and anisotropic microstructure. Biomaterials, v.29, n.10, Apr, p.1541-51. 2008.
- [388] Harris, A. K. Cell surface movements related to cell locomotion. Ciba Found Symp, v.14, p.3-26. 1973.
- [389] Kessler, D., S. Dethlefsen, *et al.* Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype. J Biol Chem, v.276, n.39, Sep 28, p.36575-85. 2001.
- [390] Egeblad, M. e Z. Werb. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer, v.2, n.3, Mar, p.161-74. 2002.
- [391] Hinz, B., P. Pittert, *et al.* Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions. Mol Biol Cell, v.15, n.9, Sep, p.4310-20. 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)