

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 24/09/2017.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**Análise dos elementos moduladores do citoesqueleto no processo
fibrosante hepático em células LX-2 tratadas e não tratadas com
o peptídeo vasoativo Angiotensina-(1-7) e a função
moduladora dos microRNAs 1179 e 1254**

LETÍCIA ROCHA GONÇALVES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)

**Março
2017**

LETÍCIA ROCHA GONÇALVES

Análise dos elementos moduladores do citoesqueleto no processo fibrosante hepático em células LX-2 tratadas e não tratadas com o peptídeo vasoativo Angiotensina-(1-7) e a função moduladora dos microRNAs 1179 e 1254

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)

Orientadora: Prof^a. Dra. Karen Cristiane Martinez de Moraes

**Rio Claro - SP
2017**

574.2 Gonçalves, Letícia Rocha
G635a Análise dos elementos moduladores do citoesqueleto no processo fibrosante hepático em células LX-2 tratadas e não tratadas com o peptídeo vasoativo Angiotensina-(1-7) e a função moduladora dos microRNAs 1179 e 1254 / Letícia Rocha Gonçalves. - Rio Claro, 2017
102 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Patologia. 2. Fibrose hepática. 3. HSCs. 4. Linhagem celular LX-2. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise dos elementos moduladores do citoesqueleto no processo fibrosante hepático em células LX-2 tratadas e não tratadas com o peptídeo vasoativo Angiotensina-(1-7) e a função moduladora dos microRNAs 1179 e 1254

AUTORA: LETICIA ROCHA GONÇALVES

ORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Ora. KAREN MARTINEZ DE MORAES
Departamento de Biologia/ Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Profa. Ora. MARCIA REGIÁ BROCHAGA
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Profa. Ora. MARCIA REGINA COMINETTI
Departamento de Biologia / Universidade Federal de São Carlos

Rio Claro, 24 de março de 2017

Dedico este trabalho aos meus pais
que tanto amo.

Ao meu namorado Fábio pelo
companheirismo e amor incondicional
compartilhados.

Aos meus familiares e amigos que
confiam em mim.

À minha avó Leonor (*in memoriam*) por
ter me ajudado a despertar o amor
pelos estudos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à vida, a Deus, tudo de bom que nos circunda e nos permite ser o que quisermos;

À minha mãe Cecília Rocha por caminhar comigo, sempre unida a mim, nesta etapa maravilhosa que é a vida;

Ao meu companheiro, namorado e grande amigo Fábio Gonçalves de Oliveira, pelo apoio, pelos nossos estudos sobre o nosso ser, que tanto me deram força nesta fase e além disso, pelo amor incondicional compartilhados;

À minha professora e orientadora Karen, por confiar em mim, me receber de braços abertos, pelos ensinamentos e apoio nos meus momentos mais alegres e tensos do mestrado;

Aos meus irmãos Luiz Carlos, Leandro e Lenita Rocha Gonçalves, meu pai Luís Carlos Gonçalves e meus sobrinhos, Yara Beatriz e Luiz, pelo amor maravilhoso que nos enlaça;

À toda minha família Rocha que tanto amo;

Ao José Luís Gonçalves de Oliveira e Rosana Geromel de Oliveira, pelo apoio e confiança incondicional na realização desta minha tão sonhada etapa. À Letícia, ao Eduardo e à Cindy, pela torcida dessa minha conquista, juntamente com todos os outros componentes da família. Em especial a Rosimeire Geromel, por ter estado tão perto dessa minha etapa, transmitindo-me sempre muito carinho.

Aos meus eternos professores da graduação na Uniararas, por sempre transmitirem amor pela Biologia e pelo trabalho. Em especial à professora Cyntia que foi meu anjo da guarda, à professora Camila, que me cativou desde a sua primeira aula relacionada a biologia molecular e ao professor Carlos, pelo total apoio nas minhas escolhas e por defender tão bem a formação dos seus alunos;

Ao escritório Braghin e toda a família, por compartilharem comigo as coisas mais sagradas da existência, boas energias, amizade e carinho. Vocês estão no meu time e eu nos seus.

À minha doce amiga bióloga Camila Cristiane Pansa, pelo total apoio e amor a mim sempre transmitido;

À minha amiga-irmã Márcia, que foi uma das melhores pessoas que conheci nesses dois anos em Rio Claro, pela leveza e conversas extremamente construtivas durante várias horas, além das nossas refeições deliciosas;

Aos amigos de laboratório, em especial à minha parceira Brenda Oliveira, que marcou minha vida, com sua alegria, amizade e amor de amiga. À Juliana Miranda pela nossa amizade, desde que a Ju chegou eu gostei dela e cada dia mais admirava sua dedicação e sua vontade de aprender. À Letícia Scarinci, pela sua atenção e por ser como é, calma e cheia de boas energias. À Letícia Ramos por sua amizade e por sempre estar disposta a socorrer qualquer um, a qualquer hora. Ao kelvin Lima, pelas risadas que alegravam muito o laboratório. À Ana Paula, a consultora dos astros, por ser tão atenciosa e dedicada a todos e a tudo a sua volta. À Lara, pela espontaneidade mega engraçada e pelos fatos absurdamente cômicos que ocorrem na sua presença. Ao Caio, à Marina e à Priscila, por me darem sempre atenção e serem guerreiros. Cada qual com seu jeito, porém todos sempre unidos e sempre amigos;

Ao grupo da professora Márcia Regina Brochetto Braga, (Murilo Bazon e Amilcar) pelos cafés em conjunto, conselhos e os momentos compartilhados, todos sempre me cativaram;

À Cris, pela amizade, carisma e caronas que tanto me ajudaram;

Aos alunos de vários outros grupos do departamento que compartilharam ajudas e risadas nos corredores. Em especial ao João Rodolfo e ao Franco, por me socorrerem sempre;

A todos do departamento de Biologia, do programa de Ciências Biológicas, com ênfase em Biologia Celular e Molecular, pelo apoio e por permitir que eu torne o meu sonho real.

Aos meus amigos do IAC, em especial ao Pedro Ramos González pelos ensinamentos da biologia molecular, amizade e confiança. Aos meus amigos, sempre amigos, Alex Júnior Soares, Camila Chabi, Flávia Crivelari e Lísia Borges, pelas conversas, aprendizados e energias boas compartilhadas. E a todos os outros que compartilharam momentos especiais na minha iniciação científica.

À CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

“A coisa mais perfeita que podemos experimentar é o misterioso. É a fonte de toda a arte e de toda ciência verdadeira”

(Albert Einstein)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-A Representação ilustrativa de um fígado normal.....	15
Figura 1-B Células do tecido hepático a partir de um fígado lesionado.....	15
Figura 2 Esquema do mecanismo de ação da Angiotensina (Ang).....	20
Figura 3 Biogênese do miRNA	22
Figura 4 Organograma dos modelos celulares investigados.....	27
Figura 5 Representação esquemática dos vetores de clonagem.....	34
Figura 6 Expressão relativa dos miRNAs 1179 e 1254.....	42
Figura 7 Redes moleculares entre miRNAs	43
Figura 8 Eletroforese em gel de agarose	44
Figura 9 Confirmação da transfecção celular	45
Figura 10-A Análises de microscopia nas LX-2 2%, 10% e 10% tratada com Ang-(1-7).....	46
Figura 10-B mRNAs marcadores do processo fibrosante hepático.....	47
Figura 10-C Análise de microscopia de campo claro LX-2 2%, 10% e 10% tratadas com Ang-(1-7).	50
Figura 11-A Análises de microscopia nas LX-2 pEP-miR controle, -1179 e -1254..	52
Figura 11-B mRNAs marcadores do processo fibrosante hepático.....	54
Figura 11-C Análise de microscopia de campo claro LX-2 2 pEP-miR controle, -1179 e 1254.....	56
Figura 12 mRNA alvo do miRNA 1179	58
Figura 13 mRNAs alvos do miRNA 1254	60
Figura 14 mRNAs – elementos de adesão	63
Figura 15 mRNAs – elementos estruturais e interação	67
Figura 16 mRNAs – elementos de sinalização celular.....	71
Figura 17 mRNAs – RT-PCR	75
Figura 18 Expressão proteica de TGF β -1	79
Figura 19 Expressão proteica de α SMA, Mical2, TGF β -2 e β actina.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR.....	37
Tabela 2 Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qRT-PCR.....	39
Tabela 3 Alvos putativos dos miRNAs 1179 e 1254 e outros genes moduladores do citoesqueleto investigados.	75

Resumo

As doenças hepáticas são consideradas um problema sério em todo o mundo e vários elementos influenciam o desenvolvimento dessas patologias. Diabetes, doenças de síndrome metabólica, problemas nutricionais e infecção por vírus são elementos responsáveis pelo surgimento de doenças hepáticas. Não há nenhuma estratégia terapêutica eficaz disponível para tais doenças e, por isso, são necessários mais estudos para elucidar um entendimento molecular dos mecanismos celulares. As células estreladas hepáticas (HSCs) sustentam o desenvolvimento da fibrogênese hepática pela produção exacerbada de colágeno e outros elementos da matriz, quando ativadas. Além disso, algumas terapias alternativas apontam o peptídeo Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] como importante elemento modulador da fibrogênese hepática. Entre os elementos alvo do heptapeptídeo, os microRNAs (miRNAs) apresentam alterações em seu perfil de expressão gênica. Essas pequenas moléculas vêm sendo amplamente investigadas por suas múltiplas funções no equilíbrio celular. Assim, para o desenvolvimento de novos fármacos é muito importante entender a função moduladora da Ang-(1-7) e dos miRNAs sobre a homeostase celular. Neste estudo, foram investigados por meio da linhagem HSCs humana LX-2 elementos moduladores do citoesqueleto dessas células em diferentes condições de cultivo: culturas quiescidas, ativadas/ pró-fibrosadas, ativadas/ pró-fibrosadas e tratadas com o peptídeo vasoativo e ativadas/ pró-fibrosadas que superexpressam os miRNAs 1179 ou o miRNA 1254, por serem esses uns dos miRNAs superexpressos quando com o tratamento com o peptídeo vasoativo. Utilizando ensaios de microscopia de fluorescência e análise de expressão gênica, os resultados apontaram para efeito modulador do peptídeo na reversão do processo fibrosante hepático; também foram apontados a característica deletéria da superexpressão do miRNA 1179 e o potencial controlador da fibrogênese modulada pela superexpressão do miRNA 1254. O conjunto de resultados reforça que o peptídeo atua na biologia dos sistemas de maneira a compensar modulações negativas e positivas na expressão gênica de células alvo, embora em nosso modelo atue favoravelmente na reversão do processo prófibrosante hepático.

Palavras-chave: angiotensina (1-7); fibrose hepática; HSCs; Linhagem celular LX-2; microRNAs 1179 e 1254.

Abstrat

Liver diseases are considered a serious problem worldwide and several elements influence the development of these pathologies. Diabetes, diseases of metabolic syndrome, nutritional problems and virus infection are elements responsible for the emergence of liver diseases. However, no effective therapeutic strategy is available for such diseases, and therefore further studies are needed to elucidate a complete molecular view of cellular mechanisms. However, hepatic stellate cells (HSCs) are known to support the development of liver fibrogenesis by the exacerbated production of collagen and other matrix elements when activated. In addition, some alternative therapies point to the peptide Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] as a relevant modulatory element in the control of liver fibrogenesis. Considering the heptapeptide target elements microRNAs (miRNAs) changes their expression pattern in cells under the effect of the ang-(1-7). Such small molecules have been widely investigated for their multiple roles in cell balance and homeostasis. Thus, for the development of new drugs, it is very important to understand the modulatory function of Ang-(1-7) and miRNAs on cellular homeostasis. In this study, the human HSC strain LX-2 was investigated by cytoskeletal modulators of these cells under different culture conditions: quiescent, activated / pro-fibrous, activated / pro-fibrous and vasoactive peptide-activated fibroblasts overexpressing the 1179 miRNAs or 1254 miRNA. Using fluorescence microscopy assays and gene expression analysis, the results indicated a modulatory effect of the peptidum on the reversal of the liver fibrosing process. The deleterious characteristic of clone-1179 and the potential controller of fibrogenesis modulated by clone 1254 were also demonstrated. Moreover, the combined results reinforce that the pepetide acts in system biolgy in a manner to compensate negative and positive bias in gene expression in target cell; however the combined effect on profibrotic condition reversion still positive.

Key words: angiotensin-(1-7); hepatic fibrosis; HSCs, LX-2 cell line; microRNA 1179 and 1254

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
1.1. Fibrose hepática	13
1.2. Elementos celulares e moleculares da fibrose hepática	14
1.2.1. Células estreladas hepáticas	14
1.2.2. O citoesqueleto	18
1.3. O sistema renina-angiotensina e sua correlação com a fibrose hepática: o papel da Ang-(1-7)	19
1.4 Biogênese do MicroRNA (miRNA)	21
1.4.1. Terapêutica baseada em miRNA para doenças hepáticas	24
1.5. Análises Preliminares	25
2. Objetivos	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. Material e métodos	26
3.1. Cultura celular, curva de crescimento e tratamentos	26
3.2 Extração de RNA total e miRNA, e transcrição reversa.....	28
3.2.1. Extração de RNA total	28
3.2.2. Transcrição reversa: RNA	29
3.2.3. Extração de miRNA.....	29
3.2.4. Transcrição reversa: miRNA	30
3.2.5. Análise de bioinformática	30
3.3. Clonagens dos hsa-miR-1179 e hsa-miR-1254	31
3.3.1. Extração do DNA genômico (gDNA) de células LX-2	31
3.3.2. Amplificação das sequências precursoras dos hsa-miR-1179 e hsa-miR-1254 por PCR..	31
3.3.3. Digestão com enzimas de restrição	32
3.3.4. Reação de ligação.....	32
3.3.5. Transformação bacteriana e sequenciamento das sequências sense e anti-sense do vetor pEP-miR.....	33
3.3.6. Estabelecimento dos clones celulares	34
3.4. Análises de Microscopia	36
3.4.1. Marcação de núcleo e citoesqueleto	36

3.4.2. Marcação de lipídios pelo método <i>Oil Red 3</i>	12
3.6. Análise de expressão gênica por reações em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	36
3.7. Análise por <i>Western blot</i>	38
3.9. Análises estatísticas.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Análises preliminares	42
Com o aumento expressivo da expressão dos miRNAs em análise, optou-se pela obtenção de um clone celular que superexpressasse tais moléculas, para uma análise funcional dos mesmos no equilíbrio e na transdiferenciação das células LX-2.	43
4.2. Análise das clonagens dos hsa-miR 1179 e hsa-miR 1254	44
4.3. Análises dos clones celulares	45
4.5. Análises morfofisiológicas e moleculares das células LX-2	46
4.6. Redes de interações moleculares: avaliação do perfil de expressão de genes moduladores do citoesqueleto.....	57
4.6.1. mRNA alvo do miRNA 1179.....	58
4.6.2. mRNAs alvo do miRNA 1254	59
4.6.3. Outros elementos moduladores do citoesqueleto: elementos de adesão.....	62
4.6.4. Elementos estruturais e de interação células a células	66
4.6.5. Elementos de sinalização celular	70
5. Níveis da expressão proteica de TGF β -1 nas células LX-2 ativadas tratadas e não tratadas com Ang-(1-7) e LX-2 ativadas clones 1179 e 1254 pelo método de ELISA	79
6. Níveis da expressão das proteínas α -SMA, Mical 2 e TGF β -2 nos grupos celulares LX-2 investigados.....	80
7. Conclusão	83
8. Referências bibliográficas.....	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fibrose hepática

O fígado, a maior glândula que funciona como glândula endócrina e exócrina, é o segundo maior órgão do corpo humano e desempenha várias funções importantes no organismo como: síntese e secreção de bile, gliconeogênese, síntese de proteínas, metabolização de substâncias tóxicas, armazenamento de vitamina entre outras (Junqueira, Carneiro, 2004). Este órgão é dividido em células parenquimatosas e não parenquimatosas. Os hepatócitos, pertencentes às células do parênquima, são as principais células do fígado e correspondem a 80% do volume total do órgão. Estes estão organizados em unidades denominadas lóbulos hepáticos e são responsáveis pela atividade metabólica e pela secreção de componentes da bile. As células não parenquimatosas compreendem as células de *Kupffer*, células endoteliais sinusoidais e células estreladas hepáticas (HCS) (Bloom, Fawcett, 1994; Senoo et al., 2010).

As doenças hepáticas crônicas são consideradas graves problemas de saúde pública e causou a morte de mais de 1,5 milhões de pessoas por ano, segundo levantamento da Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2012). Agentes químicos e biológicos podem promover patologias no fígado como: fibrose hepática, esteatose hepática alcoólica e não alcoólica, carcinoma hepatocelular, hepatite e cirrose.

A fibrose é um processo patológico comum a todas as doenças do fígado e pode ser desencadeada na permanência da lesão hepática por um período considerável. A resposta inicial à lesão hepática é o recrutamento de células inflamatórias que secretam citocinas reguladoras da resposta inflamatória. Classicamente são secretados o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformante-beta (TGF- β), o fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), entre outros. Desempenham importante papel na fibrogênese hepática, pois, estimulam a proliferação, migração e ativação de células produtoras de matriz extracelular (MEC). Entre as células do tecido hepático que desempenham importante papel na produção dos elementos da MEC estão as HSC

(ROCKEY, 2001; REYNAERT et al., 2002; HERNANDEZ-GEA, FRIEDMAN, 2011; LEE, FRIEDMAN, 2011), que atuam favorecendo o processo de estabelecimento da fibrose, quando ativadas; (SENOO et al., 2010). A MEC que é constituída por colágenos (I, III, IV e VI), elastina, ácido hialurônico e glicoproteínas estruturais, correspondem a menos de 3% da área de uma secção histológica do fígado (HERNANDEZ-GEA, FRIEDMAN, 2011), mas, durante lesões crônicas, seus componentes podem aumentar aproximadamente 06 vezes (BATALLER, BRENNER, 2005), principalmente, colágeno I e III e fibronectina (HERNANDEZ-GEA, FRIEDMAN, 2011).

Em quadros clínicos em que a lesão hepática evolui para um grau mais elevado de comprometimento, existe a perda da arquitetura do órgão (Senoo, 2004), que é resultante de alterações metabólicas que acometem o órgão. Em consideração aos diferentes tipos de lesões que acometem o tecido hepático, nas lesões agudas, a expressão exacerbada de elementos da MEC será transitória e a morfo-fisiologia do tecido hepático será restaurada à sua condição normal. E em lesões crônicas e havendo persistência no acúmulo de MEC, haverá uma substituição progressiva do parênquima hepático por tecido cicatricial, resultando em cirrose (BATALLER, BRENNER, 2005). Infelizmente, embora muito dos aspectos moleculares correlacionados com o processo fibrosante hepático tenham sido estudados, ainda não existe um tratamento eficaz contra a fibrose hepática (Friedman, 2010).

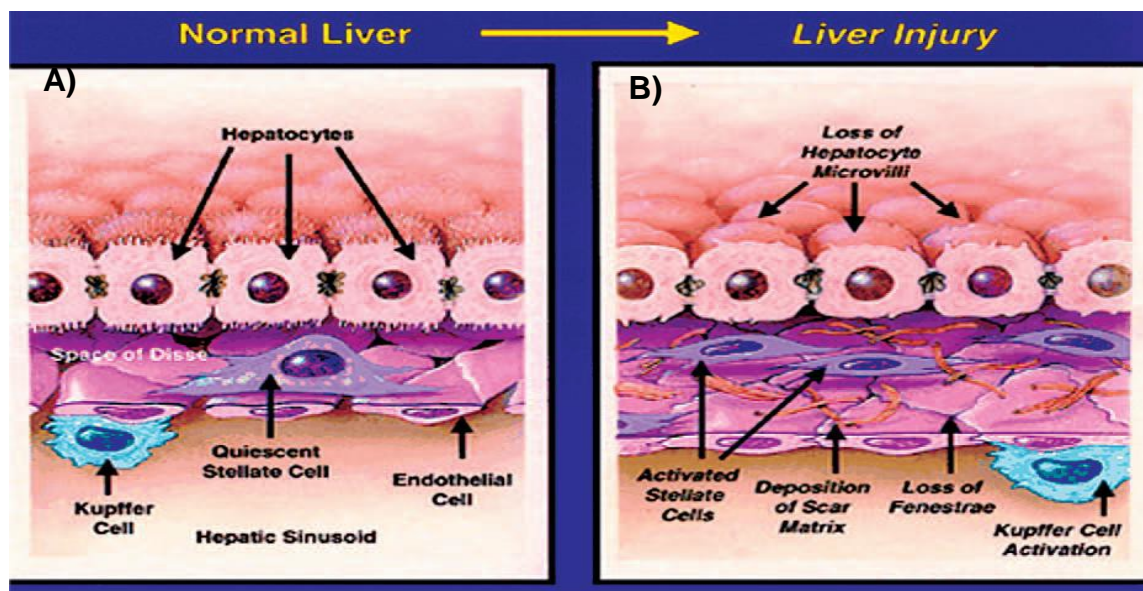
1.2. Elementos celulares e moleculares da fibrose hepática

1.2.1. Células estreladas hepáticas

As HSCs, também conhecidas como células de Ito ou células perisinusoidais, foram caracterizadas como *sternzellen* (célula em forma de estrela) (HENDERSON, FORBES, 2008), residem no espaço de Disse, entre os hepatócitos e os sinusóides (IWAISAKO et al., 2012), (Figura 1). Estudos realizados na década de 1980 já demonstraram que essas células são as principais produtoras de colágeno no fígado (FRIEDMAN et al., 1985).

As HSCs têm a função de acumular gotículas de lipídeos que são ricas em vitamina A (retinol) (Senoo, 2004; Winau et al., 2008). No fígado saudável as células estreladas encontram-se no estado quiescida, apresentando baixas taxas de mitose e de síntese de proteínas da matriz extracelular, acumulam gotículas de gordura no citoplasma e apresentam morfologia de estrela. As gotículas de gordura são compostas por lipídios neutros, principalmente por triglicerídios e ésteres de colesterol, envolvidos por uma monocamada de fosfolípido. Na lesão hepática, as células do tecido epitelial liberam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, além de recrutar e ativar as células de Kupffer, plaquetas, células inflamatórias e as células estreladas. Em consequência há a modulação do fenótipo alterado para o estado ativado (miofibroblasto). Neste estado ocorre a perda das gotículas de gordura e da forma estrelar, além do aumento na síntese de componentes da MEC, como proteínas estruturais, de colágeno e de adesão (Figura 1) (GRESSNER, WEISKIRHSCN, GRESSNER 2007; KISSELEVA e BRENNER 2008 e ALBERTS 2010).

Figura 1: Representação ilustrativa de um fígado normal (A) e células do tecido hepático a partir de um fígado lesionado (B). (A) Células do tecido hepático com fenótipo normal. (B) Há a ativação das células de Kupffer e das células estreladas, ocorrendo a perda da forma estrelar e das gotículas de gordura, além do aumento na síntese de componentes da MEC.



Quando há transdiferenciação celular várias vias de sinalização estão ativadas e o envolvimento de quinases e fosfatases se faz presente. Particularmente, a via de proteínas quinases, como a via AKT1, que se caracteriza como uma serina/treonina, estimulam a divisão celular (STEILING et al. 2004). O gene *AKT1*, pertence à família da Akt, que é composta por três membros: Akt1 (PKB- α), Akt2 (PKB- β) e Akt3 (PKB- γ). A fosforilação e ativação da Akt são conhecidas por atuar em uma variedade de estímulos, como fatores de crescimento (DATTA et al. 1999), citocinas e hormônios, de maneira dependente da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) (FRANKE et al. 1995), sugerindo uma importante função desta via na atividade mitogênica celular. A AKT1 é descrita como responsável pela ativação direta da HSC, devido a relação com o aumento da transcrição e tradução de colágeno tipo 1 e a expressão de vários fatores fibrogênicos, como o PDGF (Li et al. 2014). A síntese protéica é regulada em vários níveis e envolve vários mecanismos de sinalização intracelular. Desse modo, a via quinase - Akt apresenta uma função chave neste processo de fibrose (FUJITA et al. 2007).

Outra quinase envolvida é a ROCK2, a qual está associada à Rho (ROCK), que é um efetor para a pequena GTPase Rho, e desempenha uma função central em diversas atividades celulares, incluindo a adesão celular, citocinese e expressão gênica, principalmente através de uma alteração na dinâmica do citoesqueleto de actina (TANAKA et al., 2006). A proteína Rho pertence à superfamília da Ras GTPases monoméricas. Estudos sugerem que a Rho está implicada em diversas funções fisiológicas associadas com o citoesqueleto de actina-miosina, tal como citocinese, motilidade celular e contração do músculo liso (AMANO, et al., 1996). Sabe-se que esta via de sinalização envolve a Rho quinase (ROCK), que desempenha uma função crucial na contração do músculo liso, sob a regulação da atividade da proteína fosfatase das Cadeias Leves da Miosina (MLCP) (WEBB, 2003). ROCK fosforila a subunidade de ligação à MLCP, inibindo a sua atividade e assim promove o estado fosforilado das Cadeias Leves Reguladoras da Miosina (MLC), ou seja, o estado contraído do músculo liso (AMANO et al., 2000). Tal como outras proteínas ligadas a GTP, a Rho exibe tanto a atividade de ligação GTP/GDP e a atividade GTPase, funcionando como um interruptor molecular, alternando entre

um estado inativo, ligado ao GDP (GDP-Rho) e um estado ativo, ligado GTP (GTP-Rho) (NOBES, 1994). Para o estado ativo, a Rho interage com efetores como por exemplo o ROCK2. É conhecido por regular a morfologia celular, incluindo a formação de fibras de estresse de actina-miosina e complexos de adesão focal (WANGUE et al., 2009).

O processo de ativação das HSCs é dividido em 2 fases: A primeira fase, ou fase inicial, é caracterizada pelo aumento da expressão de receptores da membrana, tornando a célula mais responsivas aos estímulos parácrinos dos hepatócitos, espécies reativas de oxigênio e lipopolissacarídeos. O segundo estágio é conhecido como perpetuação. Neste estágio as HSCs assumem o fenótipo de miofibroblasto e também passam a liberar citocinas e quimiocinas que contribuem para a permanência no estado ativado (GRESSNER, WEISKIRHSCN, 2006). O aumento da proliferação, contratilidade, quimiotaxia, expressão de componentes da MEC, e de metaloproteinases e seus inibidores, dão um novo remodelamento e depósito de MEC nos sítios de injúria (FRIEDMAN, 2008). Também liberam vitamina A e gotículas de lipídios.

Para minimizar a fibrose, existem vários mecanismos que são desencadeados pelas HSC, dentre eles a apoptose, senescência e reversão (FRIEDMAN, 2008).

Estudos *in vitro* demonstraram que as HSC podem reverter seu fenótipo e a avaliação mecanística de tais processos é imprescindível para elucidar detalhes moleculares que subsidiem o futuro desenvolvimento de novas terapias no controle e/ ou reversão da fibrose hepática. Porém, essas avaliações somente foram possíveis após o estabelecimento da linhagem LX-2 por Xu et al. (2005). A LX-2 consiste em uma linhagem celular estabelecida partir de células estreladas hepáticas de fígado humano normal, que foi imortalizada sob o tratamento em baixas condições de soro. Nessas condições de cultivo, a LX-2 expressa o fenótipo quiescida, que é encontrado no fígado normal. Sob altas concentrações de soro, a célula LX-2 se transdiferencia e assume o fenótipo ativado (fibrosante, encontrado na lesão hepática). Sendo assim, dependendo da concentração de soro em que é cultivada, esta linhagem celular expressa os dois fenótipos, por isso é indicada como modelo de estudo dos mecanismos moleculares e celulares que são

desencadeados no processo fibrosante hepático. Atualmente, a linhagem LX-2 tornou-se uma aliada no desenvolvimento de estratégias terapêuticas e na elucidação de particularidades mecanísticas da fibrose hepática.

1.2.2. O citoesqueleto

O citoesqueleto consiste de uma complexa rede de proteínas distribuídas de maneira dinâmica, que participa dos processos de plasticidade, transporte e sinalização celular, além de ser o principal determinante da morfologia celular (BRAY, 1981; BRADY, 2003).

De acordo com Alberts et al. (2010) e Eitzen, (2003), os componentes do citoesqueleto são os filamentos intermediários, os microtúbulos e os microfilamentos, também conhecidos como filamentos de actina. Os filamentos intermediários revestem a face interna do envoltório nuclear e no citosol são distribuídos sob a forma de microtrabéculos, proporcionando resistência mecânica. Os microtúbulos, que são encontrados frequentemente estruturados em um arranjo citoplasmático em forma de estrela, têm origem no centro da célula interfásica. Podem se reorganizar rapidamente e formar o fuso mitótico na divisão celular, cílios e flagelos, determinando a posição de organelas delimitadas por membrana e o direcionamento do transporte intracelular. Já os filamentos de actina, revestem a face interna da membrana plasmática de células animais, dando resistência e forma a elas. Esses elementos colaboram com a organização de lamelipódios e filapódios, usados para explorar o território e o anel contrátil, que se organiza de maneira transiente para promover a divisão celular. Eles são responsáveis pela distribuição das proteínas de membrana e tráfego intracelular.

Como regra, a eficiência destes filamentos se dá devido a presença de centenas de moléculas acessórias que tanto interligam os filamentos entre si quanto os conectam aos outros componentes celulares. A estrutura citoesquelética, engloba toda a extensão da célula, unindo uma extremidade a outra. Por sua vez, as células são capazes de reorganizar-se estruturalmente em um curto tempo, pois as moléculas proteicas que compõem o citoesqueleto, são pequenas subunidades

repetitivas, que pode se dissociar em uma região e se reassociar em outra região. (ALBERTS et al., 2010).

O fenótipo expresso pelas HSCs quiescidas ou ativadas são singulares e mostram que estas representam uma população celular heterogênea, em termos de função e expressão de proteínas citoesqueléticas (GUMA et al., 2001). Desse modo, quando há transdiferenciação celular ocorre uma reorganização e expressão de proteínas de citoesqueleto, como α -actina de músculo liso (α -SMA) e desmina, genes de adesão, como o grupo das integrinas, que estabelecem conexão entre a matriz extracelular e a fibra citoesquelética da actina (CALDERWOOD et al., 2000; ALBERTS et al., 2010), além de outras moléculas mediadoras da sinalização imediata como quinases e fosfatases. Além disso, durante a transdiferenciação, são observados o aumento de citocinas pró inflamatórias e o aumento na produção dos componentes da MEC, principalmente do colágeno I e III (BURT, 1993; FRIEDMAN, 1999; KISSELEVA, BRENNER, 2006).

Neste contexto, fica evidente a necessidade de explorar o potencial terapêutico existentes nas interações biológicas envolvendo moléculas do citoesqueleto, como opção de suprimir a ativação das células estreladas hepáticas e impedir o processo de fibrose.

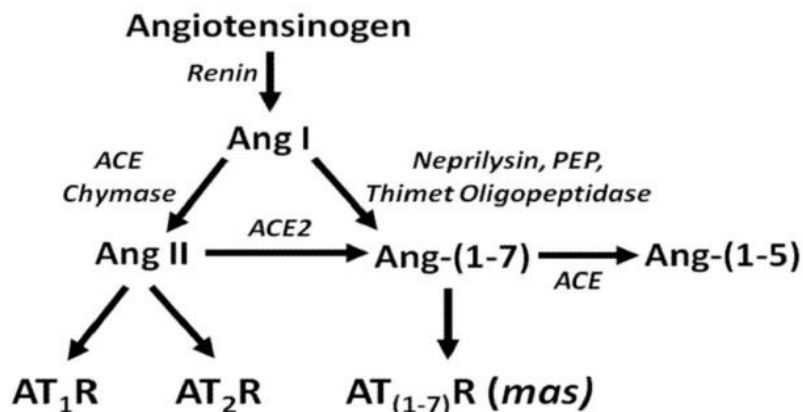
1.3. O sistema renina-angiotensina e sua correlação com a fibrose hepática: o papel da Ang-(1-7)

O sistema renina-angiotensina (SRA) se estabelece quando o composto denominado angiotensinogênio, produzido principalmente no fígado e liberado na circulação, é clivado pela ação da enzima renina e se converte no decapeptídeo Angiotensina I (Ang I). A partir desse ponto, o catabolismo da Ang I pode direcionar o sistema a duas rotas metabólicas que resultam na produção de dois peptídeos bioativos, a Angiotensina II (Ang II) e Ang-(1-7).

Esses dois compostos se diferenciam em suas extremidades carboxi-terminais, que lhes conferem atividades biológicas opostas. A formação do octapeptídeo vasoconstritor e pró-inflamatório, Ang II, é catalisada pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA ou ACE). Por outro lado, o heptapeptídeo

vasodilatador Ang-(1-7), que possui atividades anti-proliferativa, anti-trombótica e anti-angiogênica é derivado a partir da Ang I pela mediação de enzimas, tais comoneprilisinas, prolilendopeptidase e oligopeptidase *thimet* (FERRARIO et al., 1997), ou ainda a partir de Ang II, pela ação da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2 ou ACE2) (TURNER et al., 2002) (Figura 2). Os dois peptídeos encontram-se aproximadamente em quantidades equimolares e seus mecanismos de ação são intermediados pelo envolvimento de receptores celulares específicos (FERRARIO et al., 2005). A Ang II interage com os receptores de Angiotensina do tipo I (AT1) e o do tipo II (AT2), e a Ang-(1-7) atua nas células pela sua interação com o receptor MAS, o qual medeia as principais ações cardiovasculares e alguns efeitos renais dessa Angiotensina (Ang) (SANTOS et al., 2003; PINHEIRO et al., 2004; SANTOS et al., 2005; FERREIRA, SANTOS, 2005; SANTOS et al., 2006; SIMÕES, SILVA et al., 2006) e/ou AT2 (SILVA et al., 2007). (Figura 2).

Figura 2: Esquema do mecanismo de ação da Ang II e Ang (1-7). Adaptado (Paizis et al., 2002; Martinez et al., 2003; Tallant e Clark, 2003; Heralth et al., 2007; Turner et al., 2001; Vickers et al., 2002) Legendas: Ang – Angiotensina; ECA ou ACE - Enzima conversora de Angiotensina (ECA ou ACE); AT1R - Receptor de Angiotensina tipo 1; AT2R - Receptor de Angiotensina tipo 2 e AT1-7R - Receptor de Angiotensina tipo 1-7.



Particularmente a Ang- (1-7) tem um número de ações importantes, incluindo vasodilatação (FERRARIO et al., 2005; MARANGONI et al., 2006) e inibição da proliferação celular (TALLANT et al., 2005; GROBE et al., 2007), bem como anti-hipertensão (BENTER et al., 1995) e efeitos antiarrítmicos (FERREIRA et al., 2001). A Ang-(1-7) exerce ações opostas à Ang II, conferindo ao sistema uma influência

dual em vários tecidos (MACHADO et al., 1999; KUCHARIEWICZ et al., 2002; FERRARIO, CHAPPELL, 2004; FERREIRA, SANTOS, 2005; SIMÕES, SILVA et al., 2006). Há estudos que sugerem que a Ang II poderia mediar e exacerbar a fibrose hepática pela ativação das células estreladas e pelo estímulo ao TGF β 1 (BATALLER et al., 2000; BISSELL et al., 2001; JONSSON et al., 2001; YANG et al., 2002; FRIEDMAN, 2003; BATALLER, BRENNER, 2005). Por outro lado, existem indícios de que o antagonismo à Ang II, através do tratamento com inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) ou com antagonistas dos receptores angiotensinérgicos do tipo 1 (AT₁), pode exercer um efeito benéfico nas hepatopatias (BATALLER et al., 2000; GIRGRAH et al., 2000; YANG et al., 2002). Outros estudos ainda evidenciaram o efeito benéfico da Ang-(1-7) sobre a fibrose hepática utilizando antagonista do receptor MAS[7-D-Ala]-Ang-(1-7) (A779). O tratamento do fígado fibrótico com A779 diminui os níveis de TGF- β 1, demonstrando que a estimulação do receptor MAS apresenta um papel protetor contra fibrose (PEREIRA et al., 2006). Em outro estudo, a infusão de Ang-(1-7) em ratos com ducto biliar ligado, diminuiu a expressão de RNAs mensageiros (RNAm) de colágeno 1 e reduziu também os níveis transcricionais e protéicos de α -SMA, promovendo uma redução da fibrose e indicando uma inibição das células estreladas pela Ang-(1-7) (LUBEL et al., 2009).

O tratamento com inibidores da ECA e bloqueadores do receptor AT₁, mostrou-se benéfico nas doenças do fígado. Estes resultados demonstram como a Ang II/AT₁/TGF- β 1 atuam no fígado como agentes mediadores da fibrose (GIRGRAH et al., 2000; LEE et al., 2000). Dessa maneira, a Ang-(1-7) é um alvo em potencial para desenvolvimento de futuras terapias voltadas para doenças crônicas do fígado (PAIZIS et al., 2005).

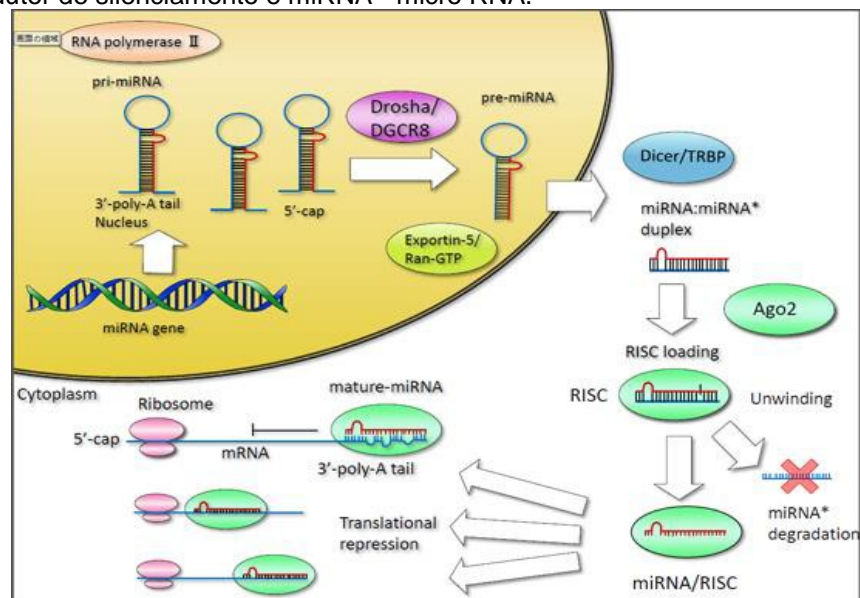
1.4 Biogênese do MicroRNA (miRNA)

Os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs endógenos não codificadores, que desempenham um papel importante na regulação gênica, sendo esta uma característica conservada das células eucarióticas (MOLNÁR et al., 2007).

A transcrição de um gene de miRNA é gerado, no núcleo celular, a partir de

um transcrito primário (pri-miRNA) que é processado pela enzima Drosha em um miRNA precursor (pre-miRNA). Este apresenta uma estrutura em forma de grampo de cabelo (*hairpin*). Em seguida é exportado para o citoplasma e uma endonuclease RNase III não-específica, denominada Dicer, reconhece esse duplex de RNA e os cliva, liberando uma das fitas, denominada de fita guia ou miRNA maduro, o qual fará parte do complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), os quais apresentam como componente central proteínas Argonautas (AGO) (BARTEL, 2009; SCHWARZ et al., 2003). Tendo aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento (LAGOS-QUINTANA et al., 2001), esses miRNAs maduros se ligam a porção 3'-UTR (3'- não traduzida) de mRNAs específicos e podem então provocar a parada da tradução ou a degradação desse mRNA (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014) (Figura 3).

Figure 3: Biogênese do miRNA. HAYES, CHAYAMA, 2016. Legenda: Ago2 - Agornaut; RISC - complexo indutor de silenciamento e miRNA - micro RNA.



Os miRNAs também são encontrados na corrente sanguínea e espaços extracelulares (VALADI et al., 2007). Estes são distribuídos em microvesículas e exossomos circulantes, atuando como mensageiros que apresentam o potencial de influenciar as funções de células e tecidos em locais distantes de origem. No entanto

mais estudos precisam esclarecer o mecanismo de atuação desses miRNAs, os quais estão sendo utilizados como biomarcadores para várias patologias, devido a sua grande estabilidade no soro e plasma (STARKEY et al., 2011). Além disso, os miRNAs podem interagir com diferentes moléculas mensageiras alvo, controlando níveis transcricionais e traducionais das moléculas alvo dentro de uma complexa rede de interações sistêmicas (GRIFFITH-JONES et al., 2005). Segundo Friedman (2009), os miRNAs atuam sobre a regulação de quase todos os processos biológicos das células e estão envolvidos no equilíbrio celular e no estabelecimento de patologias humanas. Conseqüentemente, podem ser ferramentas para o diagnóstico e prognóstico das mais diversas patologias (GARZON et al., 2010, MENDEL, OLSON, 2012).

Têm sido relatados estudos de padrões de alta expressão de miRNAs específicos em órgãos, como no coração, o miR-1 é que representa esse padrão, no cérebro o miR-9, miR-133 e miR-206, no pâncreas, o miR-7 e o miR-375, na tireoide o miR-16 e no fígado o miR-122 (LAGOS-QUINTANA et al., 2002). Essas características associadas em diferentes órgãos, podendo ser no mesmo organismo, podem ser chamadas de assinaturas de expressão gênica. As quais são dinâmicas, ou seja, sensíveis a alterações durante o desenvolvimento, mudanças no ambiente, presença de doenças e terapia com drogas (BIRCHLER, VEITIA, 2007; ECKHARDT et al., 2004).

Particularmente no fígado, de acordo com Teng (2015), os miRNAs miR-21, miR-221/222 e miR-181b promovem a fibrose hepática através do TGF- β , enquanto miR-9b, miR-101, miR-122 e miR-214-3p previnem a fibrose pela inibição da síntese de colágeno e da ativação da via TGF- β . Além disso, nas células estreladas hepáticas, os miR-15b e miR-16 atuam aumentando a apoptose, reduzindo o número de células ativadas e atenuando a fibrose (GUO et al., 2009). A baixa expressão de miR-27a e 27b, aumenta a expressão do receptor retinóide X- α , permite que as células estreladas ativadas apresentem o fenótipo quiescida (JI et al., 2009); a superexpressão de miR-150 e miR-194 inibiu a ativação da célula estrelada e a produção de componentes da matriz extracelular, via inibição da expressão de c-myb e rac (VENUGOPAL et al., 2010).

A regulação da expressão dos miRNAs pode ser uma alternativa terapêutica em diversas patologias. Normalizando o padrão de expressão de miRNAs que se apresentam super- ou sub-expressos, inibindo ou induzindo a expressão respectivamente (THUM et al., 2007; VAN ROOIJ, OLSON, 2007). Com a combinação dessas duas ferramentas, torna-se possível identificar não somente genes regulados por miRNAs, mas também processos celulares afetados por miRNAs específicos (TAKAHASHI et al., 2013), sendo uma avaliação de extrema importância para elucidação de seu papel em várias redes regulatórias celulares.

1.4.1. Terapêutica baseada em miRNA para doenças hepáticas

O grande número de miRNAs no genoma humano e a abundância de mRNAs controlados por essas moléculas sugerem ampla possibilidades oferecidas pelos padrões de expressão de miRNAs (ANDREOLI et al., 2014). Evidências mostram que os miRNAs exercem uma função crucial no desenvolvimento de muitas doenças humanas, podendo ser também marcadores do progresso, prognóstico, diagnóstico e na avaliação de resposta aos tratamentos (BLENKIRON, et al., 2007). Grandes empresas na área biotecnologia farmacêutica, como a Merck, Regulus e RoHSC, estão se movimentando para utilizar miRNAs como diversas oportunidades terapêuticas (GRANT, 2014).

Segundo Lorenzi e Zanette (2015), a terapêutica baseada em miRNA é com o uso de drogas inibidoras de miRNAs, como o medicamento Miravisen, que está em fases de testes. Este medicamento é para o tratamento da hepatite C, que atua como inibidor do miR-122 e em testes com humanos, verificou-se que doses de 5mg/ kg, durante quatro semanas, houve a eliminação completa da contagem viral (LINDOW; KAUPPINEN, 2012, JANSSEN et al., 2013).

A compreensão da biologia dos miRNAs e a sua função nos processos patogênicos é uma nova e estimulante fronteira na medicina (CARVALHO-OLIVEIRA, et al., 2012).

1.5. Análises Preliminares

Considerando o processo de fibrose hepática e a investigação de elementos-chaves que regulam a reversão do processo fibrosante, investigamos miRNAs que atuam como elementos moduladores do equilíbrio celular e na reversão do processo pro-fibrosante hepático. Utilizando células estreladas hepáticas humanas, LX-2, que possuem a capacidade de se transdiferenciar em cultura celular do estado quiescente para o fibrosado, foi investigado o papel da Ang-(1-7) na expressão de 752 miRNAs utilizando a plataforma no *miRCURY LNA™ Universal RT miRNA PCR - Human miRNA PCR panel I+II* (V4.M, Exiqon). Os resultados foram analisados, e utilizando com o *software GenEx* (<http://www.exiqon.com/qpcr-software>) e 12 miRNAs se destacaram nas análises prévias, cada um dos quais correlacionados com uma ou mais vias de sinalização que cooperam com a transdiferenciação celular (dados do laboratório não publicados). Para este estudo, foram escolhidos os miRNAs 1179 e 1254 por se correlacionarem diretamente com vias de sinalização que modulam os elementos do citoesqueleto, considerando-se as vias moleculares descritas no *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEEG - <http://www.kegg.jp>) e ferramentas online de bioinformática como DIANA TOOLS (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>). Particularmente, o algoritmo KEEG é um recurso de banco que compila informações correlatas a vias de sinalização celular, utilizando-se da biologia dos sistemas. O algoritmo DIANA TOOLS analisa possíveis redes de interações dos miRNAs com as vias do KEEG, de maneira estatisticamente segura ($p < 0.001$). Após essas análises preliminares os dois microRNAs em destaque foram escolhidos para a análise funcional dos mesmos na modulação do citoesqueleto celular e na transdiferenciação das células LX-2.

7. CONCLUSÃO

As linhagens celulares LX-2 ativadas clones 1179 e 1254 estáveis, foram estabelecidas e selecionadas com a utilização do vetor *miRNASelect™ pEP-miR Cloning and Expression Vector (CellBiolabsInc)*, o qual garante alta taxa de expressão em células de mamíferos transfectadas e do marcador de resistência à Puromicina.

Nas análises conjuntas dos resultados, verificamos que as células LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7) apresenta uma organização estrutural nos filamentos de actina semelhantes às células LX-2 quiescidas. Além disso, há alterações no padrão de formação de gotículas de lipídios no citoplasma e nas análises de qRT-PCR, nota-se que há uma atuação positiva do peptídeo, em relação a remodelação dos filamentos de actina. Em relação às células ativadas clone 1179, tanto na organização dos filamentos de actina, nas análises dos lipídeos, quanto nos resultados de qRT-PCR, notou-se os efeitos deletérios da sua superexpressão. Enquanto que nas células LX-2 ativadas clone 1254, observa-se uma organização dos filamentos de actina diferentes das células quiescidas, mas

uma atuação positiva na via de lipídeos e nas análises de qRT-PCR, onde foi observado elementos que colaboram com o controle da fibrose hepática.

Na investigação à níveis proteicos de elementos presentes nos processos de fibrose hepática, nota-se que nas células ativadas, foram obtidos resultados que corroboram com a literatura, validando assim, nosso modelo celular. Em relação às células LX-2 ativadas, tratadas com Ang-(1-7), observa-se que há atuações a níveis proteicos para o controle fibrótico. Já nas células LX-2 ativadas clone 1179, a superexpressão deste miRNA não é positiva para o equilíbrio celular investigado. Referente às LX-2 ativadas clone 1254, os níveis das proteínas avaliadas corroboram com nossa hipótese de que a superexpressão deste miRNA é positiva para o controle da fibrose.

Em resumo, as redes de interação entre miRNAs e mRNAs nortearam a análise da expressão de genes importantes no processo de modulação do citoesqueleto e do estado fibrótico. Dessa maneira, nossas hipóteses foram validadas com os resultados dos níveis das proteínas avaliadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA, S. K.; YAMADA, S.S.; YAMADA, K. M. e LAFLAMME, S. E. Transmembrane signal transduction by integrin cytoplasmic domains expressed in single-subunit chimeras. **The Journal of Biological HSCmistry**. Ed. 269 (23), pág. 15961–15964, 1994.

AKHURST, R. J. e HATA, A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. **Nat Rev Drug Discov**. V. 11, nº 10, pág. 790-811, 2012.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2009.

ALGASSIM, S. S.; et al., Modulation of MICAL Monooxygenase Activity by its Calponin Homology Domain: Structural and Mechanistic Insights. **Scientific Reports** 6. Artigo número 22176, 2016.

AMANO, M., et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). **J Biol HSCm**, V.271, 20246-20249, 1996.

AMANO, M.; FUKATA, Y.; KAIBUCHI K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. **Exp Cell Res**. V. 261, pág. 44-51, 2000.

ANDREOLI, S. C. S. et al., Utilização dos microRNAs no direcionamento da terapia e na avaliação da resposta ao tratamento do câncer colorretal. **Einstein**. V. 12(2), pág. 256-258, 2014.

ANTHONY, B.; ALLEN, J. T.; LI, Y. S. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis. **Parasites and Vectors**. V. 3, nº 1, pág. 60, 2010.

APPOLLONI, I. et al. PDGF-B induces a homogeneous class of oligodendrogliomas from embryonic neural progenitors. **Int J Cancer**. V. 11, pág. 2251–2259, 2009.

ASSANAHI, M. et al. Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses. **J Neurosci**. V. 11, pág. 6781–6790, 2006.

AVRAAMIDES, C. J.; GARMY-SUSNI, B. e VARNER, J. A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat Rev Cancer**. V. 8, pág. 604-617, 2008.

BALESTRIERI, A. Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. **Gastroenterology**. V.126, pág. 1740–1749, 2004.

BANDARU, S. et al. Targeting filamin B induces tumor growth and metastasis via enhanced activity of matrix metalloproteinase-9 and secretion of VEGF-A. **Oncogenesis**. V. 3, pág. 119, 2014.

BARKER, N.; MORIN, P. J. E CLEVERS, H. The Yin-Yang of TCF/ β -catenin signaling. **Advances in cancer research**. V. 77, pág. 1-24, 1999.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, pág. 215-233, January, 2009.

BATALLER, R. e BRENNER, D.A. Liver fibrosis. **J Clin Invest**, 115: 209-218, 2005.

BATALLER, R. et al. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. **Gastroenterology**. V. 118, pág. 1149-1156, 2000.

BENTER, I. F., FERRARIO, C. M.; MORRIS, M. e DIZ, D. I. Antihypertensive actions of angiotensin-(1–7) in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol**. 269, H313–H319, 1995.

BEUCHLE, D.; SCHWARZ, H.; LANGEGER, M.; et al. Drosophila MICAL regulates myofilament organization and synaptic structure. **Mech Dev**. V. 124, nº 5, pág. 390-406, 2007.

BHATTACHARYA, R. e CABRAL, F. A Ubiquitous β -tubulin Disrupts Microtubule Assembly and Inhibits Cell Proliferation. **Mol Biol Cell**. V.15, nº 7, pág. 3123–3131, 2004.

BIERNACKA, A.; DOBACZEWSKI, M. e FRANGOIANNIS, N. G. TGF-beta signaling in fibrosis. **Growth Factors**. V. 29, pág. 196-202, 2011.

BISSEL, D. M. et al. Transforming growth factor B and the liver. **Hepatology**. V. 34, nº5, pág. 859-867, 2001.

BLINKIRON, C., et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. **Genome Biol**. V.8, pág. R214, 2007.

BLOOM, L. e HORVITZ, H. R. The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-76* and its human homologs define a new gene family involved in axonal outgrowth and fasciculation. **Proc. Natl. Acad. Sci**. V. 94, pág. 3414-3419, 1997.

BLOOM, W. e FAWCETT, D.W.A. **Text book of histology**, 12th, ed. New York: Chapman e Hall, 1994.

BRAY, D. e GILBERT, D. Cytoskeletal elements in neurons. **Annu Rev Neurosci**; pág. 505-23, 1981.

BRADY, S.; COLMAN, D. R. e BROPHY, P. Subcellular organization of the nervous system: organelles and their functions. **Fundamental neuroscience**. San Diego, 9-114, 2003.

BRIGSTOCK, D. R. The CCN family: a new stimulus package. **J Endocrinol**. V.178, pág. 169–175, 2003.

BURT, A. D. Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. **J Pathol**. V. 170,pág. 105-114, 1993.

BIRCHLER, J. A. e VEITIA, R. A. The gene balance hypothesis: From classical genetics to modern genomics. **Plant Cell**. V. 19, pág. 395–402, 2007.

CALDERWOOD, D. A. et al., Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. **J Biol HSCm**. V. 275(30), pág. 22607-10, 2000.

CALON, A.; LONARDO, E.; BERENQUER-LIERGO, A.; et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. **Nat Genet**. V. 47, pág. 320-329, 2015.

CANBAY A., FRIEDMAN S., GORES G. J. Apoptosis: The nexus of liver injury and fibrosis. **Hepatology**. Vol. 39, 2004.

CARLSON, B. M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. Ed. 5, editora Elsevier. 2014.

CARVALHO-OLIVEIRA, V. et al. MicroRNAs: um novo paradigma no tratamento e diagnóstico da insuficiência cardíaca? **Arq. Bras. Cardiol**. V.98 nº4, 2012.

CASTRO-UMÑÓZLEDO, et al. Vimentin as a marker of early differentiating, highly motile corneal epithelial cells. **J CELL PHYSIOL**. V. 232, pág. 818-830, 2017.

CHAU, B. N.; XIN, C.; HARTNER, J. et al., MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. **Sci Transl Med.** V. 4, nº 121, pág. 121, 2012.

COUZENS A. L.; SARIDAKIS, V. e SHSCID, M. P. The hydrophobic motif of ROCK2 requires association with the N -terminal extension for kinase activity. *BioHSCm J*, V. 419, nº 1, pág. 141–148, 2009.

DAI C. et al. PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. **Genes dev.** V. 11, pág. 1913–1925, 2001.

DATTA, S. R. et al. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes dev.** V. 13, nº 22, pág. 2905-2927, 1999.

DERYNCK, R. e ZHANG, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. **Nature.** V. 425, pág. 577–584, 2003.

ECKLER, J. M.e CHEN, B. Fez family transcription factors: controlling neurogenesis and cell fate in the developing mammalian nervous system. **BioEssays.** 2014.
DOI: 10.1002/bies.201400039.

EITZEN, G. Actin remodeling to facilitate membrane fusion. **Biochim Biophys Acta.** V. 1641, pág. 175-181, 2003.

ELPEK, K. G.; CREMASCO, V.; SHEN, H.; et al., The tumor microenvironment shapes lineage, transcriptional, and functional diversity of infiltrating myeloid cells. **Cancer Immunol Res.** V. 2, nº 7, pág. 655-667, 2014.

ELSHARKAWY, A. M., OAKLEY F., MANN D. A. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. **Apoptosis.** V. 10, pág. 927–939, 2005.

FAILLI, P. et al., Nitrovasodilators inhibit platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. **Gastroenterology.** V. 119, nº 2, pág. 479-492, 2000.

FARCI, P.; ROSKAMS T.; HSCSSA L.; et al. Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. **Gastroenterology.** V. 126, nº 7, pág. 1740-1749, 2004.

FLANAGAN, L. A., CHOU, J., FALET, H., NEUJAHN, R., HARTWIG, J. H., and STOSSEL, T. P. **J. Cell Biol.** V. 155, pág. 511–517, 2001.

FERRARIO, C. M.; TRASK, A. J. e JESSUP, J. A. Advances in bioHSCmical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1–7) in regulation of cardiovascular function. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** V. 289, pág. H2281–H2290, 2005.

- FERRAZ, F. B. e FERNANDEZ, J. H. Integrinas na adesão, migração e sinalização celular. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**. V. 9, pág. 25-34, 2014.
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. e ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1–7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. **Hypertension**. V. 38, 665–668, 2001.
- FERREIRA, A. J. e SANTOS, R. A. S. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). **Braz J. Med Biol Res**. V. 38, pág. 499-507, 2005.
- FRANKE, T. F. et al. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. **Cell**. V. 81, nº 5, pág. 727-736, 1995.
- FRIEDMAN, S. L.; ROLL, F. J.; BOYLES, J. e BISSELL, D. M. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. **Proc Natl Acad Sci**. V. 82, pág. 8681–8685. 1985.
- FRIEDMAN, S. L. Cytokines and Fibrogenesis. **Semin. Liver Dis**. 19:129-37. 1999.
- FRIEDMAN, S. L. Immunopathogenesis of fibrosis and relevance to therapeutic targets. **Hepatitis annual update**. Pág. 13-39, 2003.
- FRIEDMAN, S. L. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. Division of Liver Diseases, Mount Sinai School of Medicine. **Physiol Rev**. January, 88(1): 125–172., New York, 2008.
- FRIEDMAN, R. C.; FARH, K. K.; BURGE, C. B. e BARTEL D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res**. V. 19, pág. 92 - 105, 2009.
- FRIEDMAN, J.; HASTIE, T. e TIBSHIRANI, R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. **J Stat Softw**. V. 33(1), pág. 1–22, 2010.
- FUJITA, S. et al. Blood flow restriction during low-intensity resistance exercise increases S6K1 phosphorylation and muscle protein synthesis. **J appl physiol**. V. 103, nº 3, pág. 903-910, 2007.
- FUKATA, M. e KAIBUCHI, K. *Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion*. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. V. 2, pág. 887-897, 2001.
- FUCHSHOFER, R. et al. Transforming growth factor-beta 2 modulated extracellular matrix component expression in cultured human optic nerve head astrocytes. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. V. 46, 568–578, 2005.
- GAMAZON, E. R.; INNOCENTI, F.; WEI, R.; WANG, L.; ZHANG, M.; MIRKOV, S.; RAMIREZ, J.; HUANG, R. S.; COX, N. J. e RATAIN, M.J.; et al. A genome-wide integrative study of microRNAs in human liver. **BMC Genom**. V.14, pág. 395, 2013.
- GARZON, R.; MARCUCCI, G.; CROCE, C. M. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. **Nature Reviews Drug Discovery**. V. 9, pág. 775-789, 2010.

- GIRGRAH, N.; LIU, P.; COLLIER, J.; et al., Haemodynamic, renal sodium handling, and neurohormonal effects of acute administration of low dose losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in preascitic cirrhosis. **Gut**. V. 46, pág. 114-120, 2000.
- GIRIDHARAN, S. S. P.; ROHN, J. L.; NASLAVSKY, N. e CAPLAN, S. Differential regulation of actin microfilaments by human MICAL proteins. **J Cell Sci**. V. 125, nº 3, pág. 614-624, 2012.
- GIRIDHARAN, S. S. P. e CAPLAN, S. MICAL-Family Proteins: Complex Regulators of the Actin Cytoskeleton. **Antioxidants e Redox Signaling**. V. 20, nº 13, 2059-2073, 2014.
- GONÇALVES, J. O. et al. Dynamic expression of *desmin*, α -SMA and *TGF- β 1* during hepatic fibrogenesis induced by selective bile duct ligation in young rats. **Braz J Med Biol Res**. V. 47 nº10, pág. 850–857, 2014.
- GRANT, B. RoHSC set to buy RNA firm. Ontario. LabX Media Group, 2014.
- GREEN, M. R. e SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. 4^o ed. Nova York. Editora Cold Spring Harbor Laboratory Press, pág. 64-65, 2012.
- GREEN, M. R. e SAMBROOK, J. R. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 4^o ed. Nova York. Editora Cold Spring Harbor Laboratory Press, pág. 2028, 2012.
- GRESSNER, O. A.; WEISKIRHSCN, R. e GRESSNER, A. M. Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality. **J Cell Mol Med**. V. 11, nº 5, pág. 1031-51, 2007.
- GRIFFITH-JONES, S.; GROCOCK, R. J. DONGEN, S.V.; et al., Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes. **Nucleic Acids Res**. Ed. 33, pág. D121-D124, 2005.
- GRIGORIEV, I.; et al., Report Rab6, Rab8, and MICAL3 Cooperate in Controlling Docking and Fusion of Exocytotic Carriers. **Current Biology**, ed. Elsevier, v.21, pág. 967-974, 2011.
- GROBE, J. L.; MECCA, A. P.; LINGIS, M.; SHENOY, V.; BOLTON, T. A.; MACHADO, J. M.; SPETH, R. C.; RAIZADA, M. K. e KATOVICH, M. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1–7). **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**. V. 292, pág. H736–H742, 2007.
- GUMA, F. C. R. et al. Intermediate filaments modulation in an in vitro model of the hepatic stellate cell activation or conversion into the lipocyte phenotype. **BioHSCm Cell Biol**. V. 74, nº 4, pág. 409-417.
- GUN, B. T. V.; MELHSCRS, L. J.; RUITERS, M. H.; et al., EPCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. **Carcinogenesis**. V. 31, nº 11, pág. 1913-1921, 2010.
- GUO, C. J.; PAN, Q.; LI, D. G.; SUN, H.; LIU, B. W. miR-15b and miR-16 are implicated in activation of the rat hepatic stellate cell: an essential role for apoptosis, **J. Hepatol**. V. 50, nº4, pág. 766–778, 2009.

GUPTA, R. A.; SHAH, N.; WANG, K. C.; et al., Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. **Nature**. V. 464, pág. 1071–1076, 2010.

HALYKO, A., STELMACK, G. The associated of caveolae, actin and the dystrophinglycoprotein complex: a role in smooth muscle phenotype and function? **Can. J. Pharmacol.** V. 83, pág. 877-91, 2005.

HAMILTON, L. K; DUFRESNE, M.; JOPPÉ, S. E.; et al._Aberrant Lipid Metabolism in the Forebrain NiHSC Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer's Disease. **Cell Stem Cell**. V. 17, nº 4, pág. 397-411, 2015.

HAYES, J.; PERUZZI, P. P. e LAWLER, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 8, p. 460-469, 2014.

HELDIN, C. H. e MOUSTAKAS, A. Signaling Receptors for TGF-b Family Members. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**. V. 8, nº 8, 2016

HENDERSON, N. C. e FORBES, S. J. **Hepatic fibrogenesis: from within and outwith**. *Toxicology*. 254(3):130-5. 2008.

HERMEKING, H. The miR-34 family in câncer and apoptosis. **Cell Death Differ**. V. 17(2), pág. 193-199, February, 2010.

HERNANDEZ-GEA, V. e FRIEDMAN, S. L. **Pathogenesis of liver fibrosis**. *Annu Rev Pathol*. 6:425-56. 2011.

HIROYOSHI H. et al. High expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-b1 in blast cells from patients with Down Syndrome suffering from transient myeloproliferative disorder and organ fibrosis. **British Journal of Haematology**. V. 115, pág. 472-475, 2001.

HOU, J.; LIN, L.; ZHOU,W.; WANG, Z.; DING, G.; DONG, Q.; QIN, L.; WU, X.; ZHENG, Y. e YANG, Y. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma. **Cancer Cell**. 19, 232–243, 2011.

HSCN, N.; GUO, D. XU, Q.; et al.,Long non-coding RNA FEZF1-AS1 facilitates cell proliferation and migration in colorectal carcinoma. **Oncotarget**. V. 7,nº 10, pág. 11271–11283, 2016.

HUI, C.K.; LEUNG, N.; SHEK, T.W.; YAO, H.; LEE, W. K.; LAI, J.Y.; LAI, S. T.; WONG, W. M.; LAI, L. S.; POON, R. T.; LO, C. M.; FAN, S. T. e LAU, G. K. Sustained disease remission after spontaneous HBeAg seroconversion is associated with reduction in fibrosis progression in chronic hepatitis B Chinese patients. **Hepatology** 46: 690–698, 2007.

HUANG, G. e Brigstock, D. R. Regulation of hepatic stellate cells by connective tissue growth factor. **Front.Biosci**. V.17, pág. 2495–2507, 2012.

HUEN, S. C. et al. Macrophage-specific deletion of transforming growth factor- β 1 does not prevent renal fibrosis after severe isHSCmia-reperfusion or obstructive injury. **Am J Physio Renal Physiol**. V. 305, nº 477-484, 2013.

HUNG, C. M. A.; MIHSCEL, L. D.; BOZANO, L. W.; et al., Spatially-Directed Assembly of Gold Nanoparticles on Lithographically Patterned DNA Origam. **Nature Nanotechnology**. V. 5, pág. 121-126, 2010.

HYAMS, J. S. e LLOYD, C. W. **Microtubules**. Nova York. Editora John Wiley. 1993.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**. V. 110, nº 6, pág. 673-687, 2002.

HOSAKA, T.; SUZUKI, F. e KOBAYASHI, M. Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection. **Hepatology**. V. 58, nº 1, pág. 98-107, 2013.

IWAISAKO, K.; BRENNER, D. A. e KISSELEVA, T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. **J Gastroenterol Hepatol**. V. 27, nº 2 pág. 65 - 68. 2012.

JANSSEN H. L. et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. **N Engl J Med**. V.368(18), pág. 1685-1694, May, 2013.

JEON, G. W.; LEE, M. N.; JUNG, J. M.; HONG, S. Y.; KIM, Y. N.; SIN, J. B. e KI, C. S. Identification of a de novo heterozygous missense FLNB mutation in lethal atelosteogenesis type I by exome sequencing. **Ann Lab Med**. V. 34, pág. 134–138. 2014.

JI, J., ZHANG, J., HUANG, G. et al. Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation, **FEBS Lett**. V.583, nº 4, pág.759–766, 2009.

JONSSON, J. R. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. **Gastroenterology**. V. 121, pág. 148-155, 2001.

JUNQUEIRA L. C; CARNEIRO J. (2004). *Histologia Básica*. Guanabara Koogan. 10 edição.

KANDA, S. e SMITHGALL, T. E. Downregulation of the c-Fes protein-tyrosine kinase inhibits the proliferation of human renal carcinoma cells. **Int. J. Oncol**. V. 34, nº1, pág. 86-89, 2009.

KIEMA, T. et al. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. **Molecular Cell**. V: 21, pág. 337-347, 2006.

KISSELEVA, T.; UCHINAMI, H.; FEIRT, N.; QUINTANA-BUSTAMANTE, O.; SEGOVIA J. C.; SCHWABE R. F.; BRENNER D. A. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. **J Hepatol**. 45(3):429-38.2006.

KISSELEVA, T. e BRENNER, D. A. Fibrogenesis of parenchymal organs. *Proc Am Thorac Soc.* Apr 15;5 (3):338-42, 2008.

KUBICZKOVA, L. et al. TGF- β – an excellent servant but a bad master. *J Transl Med.* V. 10, pág. 183, 2012.

JOHNSON D. R. **Physiology of the Gastrointestinal Tract.** 2ª edição. New York, NY: Raven, pág. 423– 482, 1987.

JUNQUEIRA L. C. e CARNEIRO J. *Histologia Básica.* Guanabara Koogan. 10 edição, 2004.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKELI W. e TUSCHLT. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, v. 294, pág. 853-858, October, 2001.

LAGOS-QUINTANA, M. RAUHUT, R.;YALCIN, A.; et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* V. 12, pág. 735-739, 2002.

LAU, J.; CASTELLI, L. A.; LIN, E. C. e MACAULAY, S. L. Identification of elongation factor 1alpha as a potential associated binding partner for Akt2. *Mol Cell BioHSCm*, V. 286, nº 1–2, pág.17–22, 2006.

LAW, P. T.; QIN, H.; CHING, A. K.; LAI, K. P.; CO, N. N.; HE, M.; LUNG, R. W.; CHAN, A. W.; CHAN, T. F. e WONG, N. Deep sequencing of small RNA transcriptome reveals novel non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* V. 58, pág.1165–1173, 2013.

Lee, S. Y. et al. Identification of transforming growth factors actively transcribed during the progress of liver fibrosis in biliary atresia. *J Pediatr Surg.* V. 39, pág. 702-708, 2004.

LEE, J. K. et al. Effects of single dose of 50 mg captopril in patients with liver cirrhosis and ascitis. *Hepato-Gastroenterology.* V. 47, pág. 767-770, 2000.

LEE, U. E. e FRIEDMAN, S. L. **Mechanisms of hepatic fibrogenesis.** *Best Pract Res ClinGastroenterol.* 25(2):195-206. 2011.

LEGRIER, M. E.; YANG, C. P.; YAN, H. G.; et al. Targeting protein translation in human non small cell lung cancer via combined MEK and mammalian target of rapamycin suppression. *Cancer Res.* V. 67, nº 23, pág. 11300-11308, 2007.

LEITE, C. A. V. G. et al. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. *Revista brasileira de Oncologia Clínica.* V. 8, n. 29, 2012.

LI, Z. J; OU-YANG, P. H; HÁ e N X. P. Profibrotic effect of miR-33a with Akt activation in hepatic stellate cells TGF. *Cellular Signalling.* 26 141–148, 2014.

LINDOW, M. e KAUPPINEN, S. Discovering the first microRNA-targeted drug. *J Cell Biology.* V. 199(3), pág. 407-4012, October, 2012.

- LIU, Y.; LIU, H.; MEYER, C.; et al., Transforming Growth Factor β (TGF β) mediated Connective Tissue Growth Factor (CTGF) Expression in Hepatic Stellate Cells Requires Stat3 Signaling Activation. **J Biol HSCm**. V. 288, nº 42, pág. 30708–30719, 2013.
- LIU, P. et al. Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. **Nature**. V. 508, nº 7497, pág. 541-545, 2014.
- LI, D. e MRSNY, R. J. Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via downregulation of occludin. **J Cell Biol**. V. 148, nº 4, pág. 791-800, 2000.
- LI, Y.; HSCN, W.; HE, F.; et al. Neat expression is associated with tumor recurrence and unfavorable prognosis in colorectal cancer. **Oncotarget**. V. 6, pág. 27641–27650, 2015.
- LUBEL, J. S.; HERATH, C. B.; TCHONGUE, J.; et al. Angiotensin-(1–7), an alternative metabolite of the renin–angiotensin system, is up-regulated in human liver disease and has antifibrotic activity in the bile-duct-ligated. **Clinical Science**. V. 117, pág. 375–386, 2009.
- LORENZI, J. C. C. e ZANETTE D. L. **Introdução ao mundo dos micro RNAs**. Ed. Cubo, Ribeirão Preto, SP. Cap. 11, pág. 191-209, 2015.
- LUNDQUIST, M. R. Redox modification of nuclear actin by MICAL-2 regulates SRF signaling. **Cell**. V. 156(3), pág. 563-576, Jan. 2014.
- MACHADO, R. D. P.; SANTOS, R. A. S.; ANDRADE, S. P. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. **Life Sci**. V. 66, pág. 67-76, 1999.
- MAETZEL, D.; DENZEL, S.; MACK, B.; et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. **Nat Cell Biol**. V. 11, pág. 162-171, 2009.
- MAJUMDAR A. et al. Hepatic stem cells and transforming growth factor β in hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. V. 9, pág. 530-538, 2012.
- MARANGONI, R. A.; CARMONA, A. K.; PASSAGLIA, R. C.; NIGRO, D.; FORTES, Z. B. e CARVALHO, M. H. Role of the kallikrein-kinin system in Ang-(1–7)-induced vasodilation in mesenteric arterioles of Wistar rats studied in vivo in situ. **peptides**. V. 27, pág. 1770–1775, 2006.
- MARKOVICS, J. A. et al. Interleukin-1 β Induces Increased Transcriptional Activation of the Transforming Growth Factor- β -activating Integrin Subunit β 8 through Altering Chromatin Architecture. **J Biol HSCm**. Ed. 286(42), pág. 36864-36874, 2011.
- MARTIN, S. e PARTON, R. G. Lipid droplets: A unified view of a dynamic organelle. **Nat Rev Mol Cell Biol**. V. 7, pág. 373–378, 2006.
- MENDEL, J. T. e OLSON, E. N. MicroRNAs in stress signaling and human disease. **Cell**. V. 148, nº 6, pág. 1172-1187, 2012.
- MIYAMOTO, S. et al. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal ad signalling

molecules. **J. Cell Biol.** V. 131, pág. 791-805, 1995.

MOKDAD, A. H.; JABER, S.; AZIZ, M. I. A.; ALBUHAIRAN, F.; ALGHAITHI, A. e ALHAMAD, N. M. The state of health in the Arab world, 1990–2010: an analysis of the burden of diseases, injuries, and risk factors. **Lancet.** V. 383, nº 9914, pág. 309–20, 2014.

MÓLNAR, A.; SCHWACH, F. S.; TULDHOLME, D. J.; THUENEMANN, E. C. e BAULCOMBE, D. C. MiRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Nature.** v. 447, pág. 1126-1129, June, 2007.

MORANDI, E. M. et al. ITGAV and ITGA5 diversely regulate proliferation and adipogenic differentiation of human adipose derived stem cells. **Sci Rep.** Ed.6, pág. 288-289, 2016.

MORIN, L. P. β -catenin signaling and cancer. **Bioessays.** V. 21, nº 12, pág. 1021-1030, 1999.

MUBARACK M. et al. Signal Transduction Mechanisms Involved in Angiotensin-(1–7)-Stimulated Arachidonic Acid Release and Prostanoid Synthesis in Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** Ed. 284(1), pág. 388-398, 1998.

NAGAE, M. et al. Crystal structure of $\alpha 5\beta 1$ integrin ectodomain: atomic details of the fibronectin receptor. **J Cell Biol.** Ed. 197(1), pág. 131-140, 2012.

NOBES, C.; HALL, A. Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. **Curr Opin Genet Dev.** V. 4, pág. 77-81, 1994.

NOJIMA, H. et al. IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade. **Nature Cell Biology.** Ed 10, pág. 971-978, 2008.

OLIVEIRA, F. S. A contribuição do fator transformador de crescimento beta- 1 – TGF- $\beta 1$ na fibrose hepática: estudos in vivo e in vitro. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Saúde da criança e do adolescente. Porto Alegre, 2009.

OSANAI, M.; MURATA, M.; NISHIKIORI, N.; et al. Epigenetic silencing of occludin promotes tumorigenic and metastatic properties of cancer cells via modulations of unique sets of apoptosis-associated genes. **Cancer Res.** V. 66, pág. 9125–33, 2006.

PAIZIS, G. Effect of Angiotensin II type I receptor blockade on experimental hepatic fibrosis. **Journal Hepatol.** V. 35, pág. 376-385, 2001.

PAIZIS, G.; COOPER, M. E.; SHSCMBRI, J. M.; TIKELLIS, C.; BURRELI, L.M. e ANGUS, P. W. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. **Gastroenterology.** V. 123, pág. 1667-1676, 2002.

PAIZIS, G.; TIKELLIS, C.; COOPER, M.E.; et al. Chronic liver injury in rat and man upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme II. **Gut,** V. 54, nº12, pág. 1790-1796, 2005.

PAULIN, D. e LI Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. **Experimental Cell Research**. V. 301,nº 1, pág. 1-7, 2004.

PAWAR, S. C. e CRESS, A. E. Integrin alpha6 cleavage: a novel modification to modulate cell. **Exp. Cell Res**. 2007

PEREIRA, R. M. et al. The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: evidence for a protective role of Angiotensin. **J. Hepatol**. Pág. 1–7, 2006.

PEREIRA, R. M. e SANTOS, R. A. S. Dias, F.L.C.; Teixeira, M.M.; Silva, A.C..S. Renin-angiotensin system in the pathogenesis of liver Fibrosis World. **J Gastroenterol**. V. 15,nº 21, pág. 2579-2586, 2009.

PIETRAS, K. et al. PDGF receptors as cancer drug targets. **Cancer Cell**. V. 11, pág. 439–443, 2003.

PLOTZ, T. et al., The role of lipid droplet formation in the protection of unsaturated fatty acids against palmitic acid induced lipotoxicity to rat insulin-producing cells. **Nutr Metab**. 2016.

PONTICOS, M. JunB mediates enhancer/promoter activity of COL1A2 following TGF- β induction. Ed. 37(16), pág. 5378-5389, 2009.

POPOWICZ, G. M.; SCHLEICHER, M.; NOEGEL, A. A. e HOLAK, T. A. Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. **Trends Biochem Sci**. V. 31, pág. 411–419, 2006.

RAZINIA Z.; MÄKELÄ, T.; YLÄNNE, J. e CALDERWOOD, D. A. Filamins in mechanosensing and signaling. **Annu Rev Biophys**. V.41, pág. 227–246. 2012.

REYNAERT, H.; THOMPSON, M. G.; THOMAS, T. e GEERTS, A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. **Gut**. V. 50, pág. 571–581, 2002.

RESZKA, A. A.; HAYASHI, Y. e HORWITZ, A. F. Identification of amino acid sequences in the integrin beta 1 cytoplasmic domain implicated in cytoskeletal association. **The Journal of Cell Biology**. V. 117, nº 6, pág. 1321–1330, 1992.

ROCKEY, D. C. Cellular pathophysiology of portal hypertension and prospects for management with gene therapy. **Clin Liver Dis**. V. 5, pág. 851–865, 2001.

ROMBOUTS, K.; MELLO, T.; LIOTTA, F.; et al. A capacidade de ligação de actina de MARCKS medeia a montagem de filamentos de actina durante a mitose em células estreladas hepáticas humanas. **Am J Physiol Cell Physiol**. V. 303, pág. C357-C367, 2012.

- RUIFENG Y. et al. Generation of folliculogenic human epithelial stem cells from induced pluripotent stem cells. **Nat Commun.** Ed. 5, pág. 3071, 2014.
- RUNKLE, M. U. Tight junction proteins: From barrier to tumorigenesis. **Cancer Letters.** V. 337, nº 1, pág. 41-48, 2013.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2º ed. Nova York. Editora Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SANTOS, R. A. et al. Angiotensin (1-7) is an endogenous ligand for the G-protein coupled Receptor MAS. **Proc Natl Acad Sci.** V. 100, nº 14, pág. 8258-8263, 2003.
- SANTOS, R. A. et al. Angiotensin (1-7) and receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs.* V. 14, nº 8, pág: 1019-1031, 2005.
- SANTOS, R. A. e FERREIRA, A. J. Pharmacological effects of AVE 0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor agonist. **Cardiovasc. Drug Rev.** V. 24, pág. 239-246, 2006.
- SASTRY, S. K. e HRWITZ, A. F. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. **Current Opinion in Cell Biology.** V. 5, pág. 819-831, 1993.
- SCHNAPER, H. W. et al. TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol.* V. 284, pág. 243-252, 2003.
- SCHWARZ, D. S. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell,** 115, pág. 199-208, October, 2003.
- SCHWARZBAUER, J. Basement membrane: putting up the barriers. **Curr. Biol.** V. 9, pág. 242-244, 1999.
- SENOO, H.; YOSHIKAWA, K.; MORII, M.; MIURA, M.; IMAI, K. e MEZAKI, Y. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative – past, present and future, *Cell Biol. Int.* 34, 1247-1272, 2010.
- SENOO H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc.* 37:3-15, 2004.
- SILVA, D. M. R.; VIANNA, H. R.; CORTES, S. F; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SANTOS, R. A. S. e LEMOS, V.S. Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. **peptides.** V. 2, nº 8, pág. 702-707, 2007.
- SIMÕES e SILVA, A. C.; PINHEIRO, S. V. B.; PEREIRA, R. M.; FERREIRA A. J. e SANTOS R. A. S. The therapeutic potential of angiotensin-(1-7) as a novel renin angiotensin system mediator. **Mini-Ver Med HSCm.** V. 6, pág. 603-609, 2006.
- STARKEY, L. P. J; et al. Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. **Hepatology.** V. 54, pág. 1767-1776, 2011.
- STEILING, H. et al. Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. **Am J Pathol,** V. 165, pág. 1233-1240, 2004.

STOFFEL A. Targeted therapies for solid tumors: current status and future perspectives. **Bio Drugs**. V. 24, nº 5, pág. 303-316, 2010.

STOSSEL, T. P. e HARTWIG, J. H. Filling gaps in signaling to actin cytoskeletal remodeling. **Dev Cell**. V. 4, pág. 444–445, 2003.

STOTZ, H. U. e LONG, S. R. Expression of the pea (*Psium sativum* L.) α -tubulin gene TubA1 is correlated with cell division activity. **Plant Mol Biol**. V. 41, pág. 601, 1999.

TAKAHASHI, K. e YAMANAKA, S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. **Development**. V. 140, nº12, pág. 2457-2461, 2013

TALLANT, E. A.; FERRARIO, C. M. e GALLAGHER, P. E. Angiotensin-(1–7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**. V. 289, pág. H1560–H1566, 2005.

TANABE, K. Filamin C promotes lymphatic invasion and lymphatic metastasis and increases cell motility by regulating Rho GTPase in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncotarget**. V. 8, pág. 6353-6363. 2017.

TANAKA, T.; NISHIMURA, D.; WU, R. C.; AMANO, M.; ISSO, T.; KEDES, L. et al. Nuclear Rho kinase, ROCK2, targets p300 acetyltransferase. **J. Biol. HSCm**. V. 281, pág. 15320–15329, 2006.

TENG, K.Y. e GHOSHAL, K. Role of noncoding RNAs as biomarker and therapeutic targets for liver fibrosis. **Gene Expr**. V. 16, pág. 155–162, 2015.

TESTERINK N.; AJAT M.; HOUWELING M.; BROUWERS J. F.; PULLY V. V.; MANEN H. J. V.; OTTO C.; HELMS J. e VAANDRAGER, A. B. Replacement of Retinyl Esters by Polyunsaturated Triacylglycerol Species in Lipid Droplets of Hepatic Stellate Cells during Activation. **PLoS ONE**, V. 7, nº 4, 2012.

THUM, T.; GALUPPO, P.; WOLF, C.; FIEDLER, J.; KNEITZ, S.; VAN LAAKE, L. W.; et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. **Circulation**. V. 116, pág. 258–267, 2007.

TORRES-FLORES, J. M. e ARIAS, C. F. Tight Junctions Go Viral. **VIRUSES**. V. 7, nº 9, pág. 5145-5154, 2015.

TRANG, P. et al. Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumor in mice. **Mol Ther**. V. 19, nº 6, pág. 1116-1122, June, 2011.

TYURIN-KUZMIN, P. A. Nox4 and Duox1/2 Mediate Redox Activation of Mesenchymal Cell Migration by PDGF. **PLoS One**. V. 11, nº 4, 2016.

TURNER, S. D. et al. The E2 ubiquitin conjugase Rad6 is required for the ArgR/Mcm1 repression of ARG1 transcription. **Mol Cell Biol**. V. 22, nº12, pág. 4011-4019, 2002.

UHRBOM, L. et al. Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus. **Cancer Res.** V. 11, pág. 5275-5279, 1998.

UHRBOM, L. et al. Dependence of autocrine growth factor stimulation in platelet-derived growth factor-B-induced mouse brain tumor cells. **Int J Cancer.** V. 11, pág. 398–406, 2000.

VALADI, H.; EKSTROM, K.; BOSSIOS, A.; et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature cell biology.** Ed. 9, pág. 654-659, 2007.

VAN ROOJI, E. e OLSON, E. N. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. **J Clin Invest.** V. 117, nº 9, pág. 2369-2376, 2007.

VARMA, et al. The histological quantification of alpha-smooth muscle actin predicts future graft fibrosis in pediatric liver transplant recipients. *Pediatr Transplant.* V.21, doi: 10.1111/PETR.12834, 2017.

VENUGOPAL, S. K. et al. Liver fibrosis causes downregulation of miRNA150 and miRNA194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cellactivation, **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** V. 298, nº1, pág.G101–G106, 2010.

VON BUBNOFF, A. e CHO, K. W. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? **Dev Biol.** V. 239, pág. 1–14, 2001. 42.

XIAO X. et al. TGFbeta receptor signaling is essential for inflammation-induced but not beta-cell workload-induced beta-cell proliferation. **Diabetes.** V. 62, pág. 1217–1226, 2013.

XU, L. et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. **Liver.** V. 54, pág. 142-151, 2005.

WANG, S. e HIRSCHBERG, R. Bone morphogenetic protein-7 signals opposing transforming growth factor beta in mesangial cells. *J Biol HSCm.* V. 279, pág. 23200–23206, 2004.

WANGUE, Y. et al., ROCK Isoform Regulation of Myosin Phosphatase and Contractility in vascular Smooth Muscle Cells. **Circulation Research.** V: 104, pág. 531-540, 2009.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv Physiol Educ.** V. 27, 201-206, 2003.

WEYMOUTH, S. 2012 vai ficar XU, J.; Liu, X.; KOYAMA, Y. et al., The types of hepatic myofibroblasts contributing to liver fibrosis of diferent etiologies. **Front Pharmacol.**V. 5, nº 167, 2014.

WINAU, F.; QUACK, C.; DARMOISE, A. e KAUFMANN, S. H. Starring stellate cells in liver immunology. **Curr Opin Immunol.** V. 20, nº 1,pág. 68-74, 2008.

Yang, D., Buchholz, F., Goga, A., HSCn, C.Y., Brodsky, F.M., Bishop, J.M. Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** V.99, nº15, pág. 9942—9947, 2002.

YANG, C. et al. Liver Fibrosis: Insights into migration of hepatic stellate cell in response to extracellular matrix and growth factors. **Gastroenterology.** V. 124, pág. 147-159, 2003.

YU, L. et al. TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int.* V.64, pág. 844–856, 2003.

ZIEBA, et al. TGF β and BMP dependent cell fate changes due to loss of FLNB produces disc degeneration and progressive vertebral fusions. **PLOS GENETICS.** 2016.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1005936>.

ZODE, G. S. et al. Transforming growth factor- β 2 increases extracellular matrix proteins in optic nerve head cells via activation of the Smad signaling pathway. **Mol Vis.** V. 17, pág. 1745-1758, 2011.

ZUCCHINI, D. et al., Kinetic and spectroscopic characterization of the putative monooxygenase domain of human MICAL-1. **Arch. BioHSCm. Biophys.** Ed. 515, pág 1-13, 2011.