

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
CAMPUS DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

KELVIN FURTADO LIMA

ANÁLISES CELULARES E MOLECULARES DOS EFEITOS DO  
PEPTÍDEO VASOATIVO ANGIOTENSINA-(1-7) NO PROCESSO  
TUMORAL PULMONAR E A ATUAÇÃO DO MICRORNA 21-5P

Araraquara

2016

KELVIN FURTADO LIMA

ANÁLISES CELULARES E MOLECULARES DOS EFEITOS DO  
PEPTÍDEO VASOATIVO ANGIOTENSINA-(1-7) NO PROCESSO  
TUMORAL PULMONAR E A ATUAÇÃO DO MICRORNA 21-5P

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química, Universidade Estadual Paulista,  
como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karen Cristiane Martinez de Moraes

Araraquara

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

L732a Lima, Kelvin Furtado  
Análises celulares e moleculares dos efeitos do peptídeo vasoativo angiotensina-(1-7) no processo tumoral pulmonar e a atuação do microRNA 21-5P / Kelvin Furtado Lima – Araraquara : [s.n], 2016  
106 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Angiotensina. 2. Célula-adesão. 3. Metástase.  
4. Pulmões-câncer. 5. Ácido ribonucléico. I. Título.

## **DADOS CURRICULARES**

**Nome:** Kelvin Furtado Lima

**Nome em citações bibliográficas:** LIMA, K. F.

**Endereço:** Rua Professor Fransico Degni, 55, Quitandinha, Araraquara – SP

**CEP:** 14800-060

**E-mail:** kelvinf.lima@hotmail.com

## **FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO**

**2009-2014**

Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura

Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP – Ouro Preto – MG

## **PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Artigos completos publicados em periódicos**

SAKANE, K. K.; MONTEIRO, C. J.; SILVA, W.; SANTOS, P. M.; **LIMA, K. F.**; MORAES, K. C. M. Cellular and molecular studies of the effects of a selective COX-2 inhibitor celecoxib in the cardiac cell line H9c2 and their correlation with death mechanisms. Brazilian journal of medical and biological research, v. 47(1), p. 50-59, 2014.

### **Trabalhos completos publicados em anais de congressos**

**LIMA, K. F.**; MORAES, K. C. M. ANÁLISE MOLECULAR E CELULAR DOS EFEITOS ADVERSOS DE INIBIDORES COMERCIAIS DAS ENZIMAS COXS EM CULTURAS DE CÉLULAS CARDÍACAS. In: XVIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XIV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica Júnior, 2014, São José dos Campos. XVIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XIV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica Júnior, 2014.

SILVEIRA, M. B.; FERREIRA, L. R.; SILVA, B. O.; **LIMA, K. F.**; MORAES, K. C. M. ESTABELECENDO UM MODELO CELULAR PARA O ESTUDO DA HIPERTROFIA CARDÍACA. In: XVIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XIV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica Júnior, 2014, São José dos Campos. XVIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XIV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica Júnior, 2014.

### **Apresentações de trabalho em eventos**

**LIMA, K. F.**; SILVA, B. O.; SILVA, A. R.; SILVEIRA, M. B.; MORAES, K. C. M. MODULATORIES EFFECT OF THE HEPTAPEPTIDE ANGIOTENSIN-(1-7) IN A549: MIRNAS AND THE ADHESION PROCESS. 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) e 23rd International Congress of the IUBMB, Foz do Iguaçu, 2015.

SILVA, B. O.; SILVA, A. R.; SILVEIRA, M. B.; **LIMA, K. F.**; MORAES, K. C. M.

Uncovering molecular interplays of the effect of the heptapeptide angiotensin-(1-7) in A549 lung tumor cells: how miRNAs get involved. 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) e 23rd International Congress of the IUBMB, Foz do Iguaçu, 2015.

SILVEIRA, M. B.; **LIMA, K. F.**; SILVA, A. R.; MORAES, K. C. M. MODULATORY EFFECTS OF ANGIOTENSIN-(1-7), HSA-MIR-513A-3P AND HSA-MIR-4465 IN CELL ADHESION PROCESSES IN CULTURED A549 CELLS. 61° Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, 2015.

SILVEIRA, M. B.; **LIMA, K. F.**; SILVA, A. R.; MORAES, K. C. M. Redes de interações moleculares mediadas por pequenos RNAs não decodificadores: Angiotensina-(1-7) na modulação dos processos de adesão e migração celular em células de carcinoma pulmonar humano. XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, Rio Claro, 2015.

**LIMA, K. F.**; MORAES, K. C. M. ANÁLISE MOLECULAR E CELULAR DOS EFEITOS ADVERSOS DE INIBIDORES COMERCIAIS DAS ENZIMAS COXS EM CULTURAS DE CÉLULAS CARDÍACAS. XVIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XIV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica Júnior, São José dos Campos, 2014.

## **PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). MODULATORY EFFECT OF THE HEPTAPEPTIDE ANGIOTENSIN-(1-7) IN A549: MIRNAS AND THE ADHESION PROCESS. 2015.

XVIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XIV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica Júnior. ANÁLISE MOLECULAR E CELULAR DOS EFEITOS ADVERSOS DE INIBIDORES COMERCIAIS DAS ENZIMAS COXS EM CULTURAS DE CÉLULAS CARDÍACAS. 2014.

## **PRÊMIOS RECEBIDOS**

SBBq AWARD 2015 pelo melhor pôster apresentado durante a 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) e 23rd International Congress of the IUBMB, nos dias 24 a 28 de Agosto de 2015, no Centro de Convenções do Rafain Palace Hotel em Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.

## **IDIOMAS**

**Inglês:** Avançado

**Espanhol:** Razoável

KELVIN FURTADO LIMA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 15 de abril de 2016.

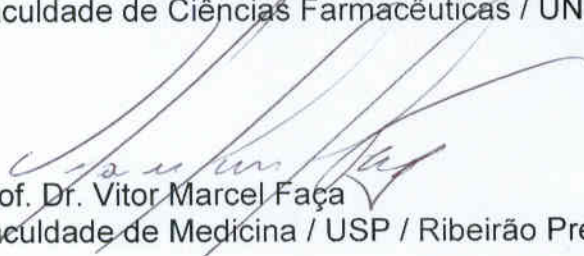
BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karen Cristiane Martinez de Moraes (Orientadora)  
Instituto de Biociências / UNESP / Rio Claro - SP



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Valeria Valente  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Vitor Marcel Faça  
Faculdade de Medicina / USP / Ribeirão Preto - SP

Dedico este trabalho a Deus que até aqui me direcionou e capacitou.

À minha amada esposa pelo companheirismo incondicional e sem fim.

Aos meus pais e família por acreditarem e confiarem na conclusão desta etapa.

Aos amigos que me acompanharam, de perto ou de longe, ao longo desta jornada.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu Deus por se fazer presente e me capacitar a realizar Sua perfeita vontade neste mundo.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karen C. M. de Moraes pela paciência em me ensinar e orientar no caminho científico desde a minha graduação.

À minha linda esposa, e melhor amiga, Lorena, por ser a pessoa maravilhosa que é, sempre me amando, me auxiliando e embarcando comigo em cada aventura que Deus nos dá.

Aos meus amados pais que me impulsionaram nesta oportunidade de crescimento pessoal e profissional através dos ensinamentos, orações e “paitrocínio”.

Aos meus irmãos pela torcida sem ao menos saberem o que eu faço da vida.

À minha família querida, sem a qual eu não chegaria aonde cheguei.

Aos meus amigos de Laboratório, ao lado dos quais eu tive a honra de trabalhar e conviver ao longo deste período: Amilcar, Andréa, Brenda, Caio, Gabriel, Letícia Ramos, Letícia Rocha, Marina, Murilo e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Regina Brochetto Braga. Em especial a minha amiga Brenda, pelo convívio, ensinamentos, conversas, risadas e mantadas, dentro e fora do Laboratório.

Aos amigos Pig, Luz, Myller, Tiritis, Paulão, Brunão, João, República Gambiarra, que independente da distância, sempre estiveram presente na minha caminhada.

À minha família Bola de Neve pelo acolhimento, amor, ensinamentos e amizades verdadeiras que mudaram a vida de dois estudantes “minerin” que caíram de paraquedas em Rio Claro.

Ao departamento de biologia da UNESP Rio Claro pela estrutura adequada para a execução deste trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

“E sabemos que todas as coisas contribuem  
juntamente para o bem daqueles que amam a Deus,  
daqueles que são chamados segundo o seu propósito.”

(Romanos 8:28)

## RESUMO

Os diferentes tipos de cânceres estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todo mundo, contabilizando 8,2 milhões de óbitos no ano de 2012. Dentre eles, o câncer de pulmão é o mais recorrente, sendo que o subtipo denominado câncer pulmonar de células não-pequenas (*non-small cell lung cancer* – NSCLC) é diagnosticado em 85% dos casos. Dada a importância epidemiológica do câncer pulmonar, associado ao platô atingido pelos tratamentos com quimioterapia e radioterapia, novas estratégias terapêuticas têm sido buscadas e neste contexto, o peptídeo vasoativo Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] tem se mostrado bastante promissor. Além da participação em uma gama de processo fisiológicos no organismo, a Ang-(1-7) está sendo cada vez mais exploradas nos processos patológicos devidos suas funções vasodilatadora, anti-hipertensiva, anti-proliferativa e antitumoral. Outros estudos apontam ainda que uma melhor compreensão da regulação gênica nos processo tumorais poderia direcionar o desenvolvimento de outros métodos terapêuticos para o câncer de pulmão. Neste sentido, os microRNAs assumem posição ímpar por sua capacidade regulatória pós-transcricional de vários genes, a citar o miR-21-5p superexpresso em vários tipos tumorais, incluindo o NSCLC. Portanto, o presente trabalho investigou os efeitos bioquímicos, moleculares e fisiológicos decorrentes do tratamento da linhagem celular tumoral A549 com Ang-(1-7), concomitantemente a análises comparativas dos efeitos da superexpressão do miR-21-5p nas células tumorais. Para isso foram utilizados os grupos celulares A549 controle e tratamento [ $10^{-7}$  M de Ang-(1-7)], e os clones A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p. Análises bioquímicas mostraram que a presença do heptapeptídeo no grupo tratamento, e as condições de cultura dos clones estudados, causaram um aumento na síntese de lactato pelas células A549. Foi observado também que a Ang-(1-7) retarda o crescimento celular. Análises de expressão gênica não apontaram ativação do processo apoptótico em nenhuma das condições estudadas, entretanto o peptídeo Ang-(1-7) modula positivamente a expressão do gene *tjp1* e negativamente a transcrição dos genes *itgb8* e *mmp-8*, sugerindo que o tratamento celular com o heptapeptídeo fortaleça as interações celulares e dificulte os processo de migração e invasão celular. Estes dados são corroborados pelo ensaio de cicatrização da ferida o qual evidenciou que a Ang-(1-7) diminui a taxa de migração celular em comparação ao grupo controle. Por sua vez, a superexpressão do miR-21-5p intensifica consideravelmente a capacidade invasiva das células tumorais como observado no ensaio da gota de agarose. Conjuntamente, os resultados apontam para o potencial terapêutico da Ang-(1-7) no controle dos processos de adesão, migração e invasão celular, e corrobora o papel do miR-21-5p na evolução e intensificação dos processos tumorais.

**Palavras-chave:** Angiotensina-(1-7), adesão e migração celular, câncer pulmonar de célula não-pequena, microRNA.

## ABSTRACT

The different types of cancers are among the leading causes of morbidity and mortality worldwide, accounting for 8.2 million deaths in 2012. Among them, lung cancer is the most frequent, and the subtype called non-small cell lung cancer (NSCLC) is diagnosed in 85% of cases. Given the epidemiological importance of lung cancer, associated with the plateau reached by chemotherapy and radiation therapies, new therapeutic strategies have been pursued and in this context, the vasoactive peptide Angiotensin-(1-7) [Ang- (1-7)] has shown quite promising. Besides participating in a range of physiological process in the body, Ang- (1-7) is being increasingly exploited in pathological processes due to its vasodilator, anti-hypertensive, anti-proliferative and anti-tumor functions. Other studies also indicate that a better understanding of gene regulation in tumor process could direct the development of other therapeutic methods for lung cancer. In this sense, microRNAs assume unique position due to its post-transcriptional regulatory capacity of several genes, for example the miR-21-5p upregulated in several tumor types, including NSCLC. Therefore, this study investigated the biochemical, molecular and physiological effects of Ang-(1-7) treatment on tumor cell line A549, concurrently to the comparative analysis of the effects of upregulation of miR-21-5p in tumor cells. In order to do this, the cell groups A549 control and treatment [ $10^{-7}$  M of Ang-(1-7)], and the A549-pEP-miR-control and A549-pEP-miR-21-5p clones were used. Biochemical analyzes showed that the presence of the heptapeptide in treatment group, and the culture conditions of the studied clones, caused an increase in lactate synthesis on A549 cells. It was also observed that Ang-(1-7) slows cell growth. Gene expression analysis showed no activation of apoptotic process in any of the conditions studied, though the peptide Ang-(1-7) positively modulates the expression of *tjp1* gene and negatively the transcription of *itgb8* and *mmp-8* genes, suggesting that the cell treatment with the heptapeptide strengthen cell interactions and prevents cell migration and invasion. These data are corroborated by wound healing assay which showed that Ang-(1-7) decreases cell migration rate compared to the control group. In turn, the upregulation of miR-21-5p considerably enhances tumor cells invasiveness as observed in the agarose spot assay. Collectively, the results point to Ang-(1-7) therapeutic potential in controlling cell adhesion, migration and invasion, and supports miR-21-5p role in the evolution and enhancement of tumor processes.

**Keywords:** Angiotensin-(1-7), cellular adhesion and migration, non-small cell lung cancer, microRNA.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação das principais vias de síntese do Sistema Renina Angiotensina (SRA).....	17
<b>Figura 2</b> - Estrutura química do peptídeo vasoativo Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] .....	18
<b>Figura 3</b> - Via esquemática de PI3K/Akt.....	19
<b>Figura 4</b> - Esquema de biogênese e atuação dos miRNAs .....	31
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática dos vetores de clonagem .....	51
<b>Figura 6</b> - Ensaio de Viabilidade de Células A549 crescidas na ausência (Controle) e presença de $10^{-7}$ M do heptapeptídeo Ang-(1-7). .....	54
<b>Figura 7</b> - Nível de expressão relativa dos miRNAs hsa-miR-1-3p e hsa-miR-21-5p em células A549 crescidas até a confluência na ausência e presença da Ang-(1-7). .....	55
<b>Figura 8</b> - Clonagem do miR-21-5p. ....	57
<b>Figura 9</b> - Confirmação da transfecção celular por reação de qPCR.....	58
<b>Figura 10</b> - Ensaio Bioquímicos. ....	60
<b>Figura 11</b> - Representação esquemática das vias celulares, extrínseca e intrínseca, do processo apoptótico.....	63
<b>Figura 12</b> - Níveis de expressão do mRNA de $\beta$ -actina e de genes envolvidos no processo de apoptose celular. ....	64
<b>Figura 13</b> - Níveis de expressão do mRNAs de genes correlatos a via de PI3K/Akt.....	65
<b>Figura 14</b> - Níveis de expressão dos mRNAs de genes correlatos às interações célula-célula e célula matriz.....	67
<b>Figura 15</b> - Níveis de expressão dos mRNAs de genes correlatos à degradação da matriz extra-celular.....	71
<b>Figura 16</b> - Ensaio de Migração Celular .....	74
<b>Figura 17</b> - Ensaio de Invasão Celular. ....	75
<b>Figura 18</b> - Ensaio de Zimografia. ....	78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR convencional e suas respectivas temperaturas de anelamento (T <sub>m</sub> ).....	46
<b>Tabela 2</b> - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR. ....	47
<b>Tabela 3</b> - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR de miRNAs envolvidos no processo tumoral pulmonar. ....	48
<b>Tabela 4</b> - Tempo de duplicação celular por grupo estudado. ....	59

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1. Importância epidemiológica do câncer de pulmão .....	13
1.2. Sistema Renina Angiotensina.....	15
1.3. O Sistema Renina Angiotensina e sua correlação com o câncer de pulmão: o papel da angiotensina-(1-7) .....	22
1.4. Participação das moléculas de adesão nos processos de carcinogênese e metástase tumoral.....	26
1.5. MicroRNAs: biogênese, função e regulação do processo tumoral.....	29
1.6. O modelo celular de investigação científica.....	34
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
2.1. Objetivo geral.....	38
2.2. Objetivos específicos .....	38
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
3.1. Cultura celular e tratamento .....	39
3.2. Ensaio de viabilidade celular .....	39
3.3. Análises bioquímicas e fisiológicas.....	40
3.3.1. Avaliação dos níveis de Lactato e pH.....	40
3.3.2. Tempo de Duplicação Celular.....	41
3.3.3. Avaliação da Migração Celular: Ensaio de Cicatrização da Ferida .....	41
3.3.4. Avaliação da Invasão Celular: Ensaio da Gota de Agarose .....	42
3.3.5. Zimografia .....	42
3.4. Extração de RNA total e miRNA, e transcrição reversa.....	43
3.4.1. Extração de RNA total .....	43
3.4.2. Extração de miRNA .....	44
3.4.3. Transcrição reversa: RNA.....	45
3.4.4. Transcrição reversa: miRNA.....	45
3.5. Análise de expressão gênica por reações de PCR convencional e PCR quantitativa em tempo real (qPCR) .....	46
3.5.1. Reações de PCR convencional .....	46
3.5.2. Reações de qPCR: mRNAs.....	47
3.5.3. Reações de qPCR: microRNAs .....	48
3.6. Clonagem do hsa-miR-21-5p.....	49
3.6.1. Extração do DNA genômico (gDNA) de células A549.....	49
3.6.2. Amplificação da sequência precursora do hsa-miR-21-5p por PCR.....	49
3.6.3. Digestão com enzimas de restrição .....	50

3.6.4.	Reação de ligação .....	50
3.6.5.	Transformação bacteriana e sequenciamento .....	50
<b>3.7.</b>	<b>Estabelecimento dos clones celulares .....</b>	<b>51</b>
<b>3.8.</b>	<b>Análise de bioinformática .....</b>	<b>53</b>
<b>3.9.</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>53</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
4.1.	Resultados de viabilidade celular .....	54
4.2.	Análises de bioinformática e qPCR de miRNAs .....	54
4.3.	Clonagem e transfecção celular: o estabelecimento dos clones celulares A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p .....	56
4.4.	Tempo de duplicação celular e análises bioquímicas .....	59
4.5.	Nível de expressão do mRNA de genes envolvidos no processo apoptótico.	62
4.6.	Análises de qPCR.....	64
4.6.1.	Expressão de genes correlatos a via de PI3K/Akt .....	64
4.6.2.	Expressão de genes correlatos ao processo de adesão/ migração tumoral....	66
4.7.	Análises fisiológicas .....	73
4.7.1.	Controle da migração celular pela Ang-(1-7).....	73
4.7.2.	Potencialização da capacidade invasiva pela superexpressão do miR-21-5p.	75
4.7.3.	Quantificação da atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Importância epidemiológica do câncer de pulmão

Cânceres estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todo mundo. No ano de 2012, aproximadamente 8,2 milhões de mortes em todo o mundo foram decorrentes dessa enfermidade, sendo que o câncer de pulmão responsável por 1,59 milhões de óbitos (WHO, 2015). No Brasil, o câncer de pulmão foi responsável por 22.424 óbitos no ano de 2011, entretanto as estimativas apontam para 28.220 novos casos em 2016 (INCA, 2016). Dentre os inúmeros fatores de risco para este tipo de câncer encontramos a predisposição hereditária, a idade, o sexo e a poluição ambiental; entretanto, 90% dos casos diagnosticados correlacionam-se ao consumo de derivados do tabaco (INCA, 2016). Apesar da forte influência negativa do tabagismo, a ocorrência desta neoplasia em indivíduos não fumantes tem sido o foco de várias pesquisas na tentativa de elucidar o complexo processo de formação e desenvolvimento do câncer pulmonar (TOH et al., 2006; WAKELEE et al., 2007).

Embora os levantamentos estatísticos destaquem a importância epidemiológica da doença, o termo câncer de pulmão é utilizado de forma generalizada para caracterizar enfermidades derivadas do crescimento celular desordenado na região das vias aéreas ou no parênquima pulmonar (IASLC, 2015). Considerando-se as particularidades anatomopatológicas, o tumor na região pulmonar pode ser classificado, principalmente, em câncer pulmonar de pequenas células (*small cell lung cancer* – SCLC) e câncer pulmonar de células não-pequenas (*non-small cell lung cancer* – NSCLC), sendo diagnosticado em 15% e 85%, respectivamente, dos casos (IASLC, 2015; INCA, 2016).

Ainda que a incidência de SCLC seja consideravelmente menor, este tipo é caracterizado como sendo a forma mais agressiva de cânceres pulmonares e está, na maioria dos casos, relacionado à exposição ao tabaco (ETTINGER; AISNER, 2006; VARGHESE et al., 2014; BYERS; RUDIN, 2014). Comparando-se as duas classificações de câncer pulmonar, o SCLC apresenta tempo de duplicação curto e rápido processo metastático (BYERS; RUDIN, 2014). Outra particularidade dos pacientes diagnosticados com SCLC é que a alta taxa de resposta (aproximadamente 70%) aos tratamentos iniciais por quimioterapia e radiação, é

drasticamente reduzida nas terapias subsequentes utilizadas após a recorrência da doença (SIMON; ARGIRIS; MURREN, 2004; BYERS; RUDIN, 2014).

O subtipo de câncer pulmonar denominado NSCLC apresenta a maior incidência sobre a população mundial, o que justifica a importância epidemiológica desta neoplasia. Apesar da significativa incidência mundial, o NSCLC ainda pode ser dividido em três variações histológicas: carcinoma epidermóide, carcinoma de grandes células e adenocarcinoma, sendo este o diagnóstico em 40% dos pacientes com câncer de pulmão (IASLC, 2015; INCA, 2015). Além da grande diversidade de fatores de risco, de acordo com a *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC, 2015), a maioria dos pacientes se encontra em estágio avançado da doença, quando diagnosticados, devido à ausência de sintomas característicos na fase inicial, elevando ainda mais a importância epidemiológica desta doença. Sintomas como sangramento pelas vias respiratórias e tosse acompanhada de muco e sangue podem ser sinais do estágio avançado da doença (IIIA e IIIB), de modo que apenas tratamentos paliativos estarão disponíveis aos pacientes (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013).

É estimado que 75% dos pacientes com NSCLC são beneficiados com a radioterapia devido às funções curativas e paliativas deste tratamento. Além disso, o tratamento com radioterapia concomitante à quimioterapia tem se estabelecido como tratamento padrão para pacientes em estágios avançados de NSCLC, uma vez que tem elevado a taxa de sobrevivência, após cinco anos desde o diagnóstico, para 20% (AUPERIN et al., 2010). Entretanto, ainda é a minoria dos pacientes que apresentam respostas positivas decorrentes do tratamento (LE CHEVALIER et al. 2005), considerando-se os sérios efeitos colaterais do tratamento.

Neste contexto, os avanços na elucidação de vias moleculares específicas têm proporcionado o desenvolvimento de drogas com ação direcionada sobre proteínas de interesse com significância no processo tumoral (KAN et al., 2010; TOYOOKA et al., 2011; DIMOU; PAPADIMITRAKOPOULOU, 2014). Além disso, com o avanço das técnicas moleculares e a compreensão do perfil genético do câncer de pulmão e do seu padrão de expressão gênica, estão sendo vislumbrados novos tratamentos e o desenvolvimento de fármacos (JU et al., 2012; IMIELINSKI et al., 2012; TESTONI et al., 2016), possibilitando, futuramente, um tratamento personalizado (DIMOU; PAPADIMITRAKOPOULOU, 2014). Atualmente, algumas terapias específicas têm apresentado resultados promissores em populações de pacientes com NSCLC;

bevacizumab age sobre o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF - *vascular endothelial growth factor*) e pode ser usado junto à quimioterapia para o tratamento de carcinoma não-epidermóide (GRIDELLI et al., 2007; HALL et al., 2015; ROLFF et al., 2016).

Outro importante alvo molecular no tratamento do NSCLC é o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR – *epidermal growth factor receptor*) (FUKUOKA et al., 2011; DIMOU; PAPADIMITRAKOPOULOU, 2014). É estimado que 40-80% dos pacientes com NSCLC apresentem super-expressão de EGFR, o qual é um receptor de tirosina quinase (TK – *tyrosine kinase*) que pode ser ativado por vários ligantes de fatores de crescimento, resultando na ativação de diversas outras vias incluindo RAS/MAPK, PI3K/Akt e STAT, as quais regulam diferentes processos celulares como síntese de DNA e proliferação (CARBONE; FELIP, 2011; RUSSO et al., 2015). A via de sinalização de EGFR encontra-se frequentemente desregulada em pacientes com câncer, principalmente devido a mutações genéticas do receptor (ZHANG, Z. et al., 2010; SHTIVELMAN et al., 2014). Tais mutações foram identificadas em 2004 por dois grupos de pesquisa distintos, analisando-se um pequeno grupo de pacientes com NSCLC que estavam em tratamento com o inibidor de tirosina quinase do EFGR (TKI) Gefitinib (PAEZ et al., 2004; LYNCH et al., 2004). A importância de compreender o funcionamento de processos tumorais associados à oncogenes específicos, como no caso de EGFR mutado em NSCLC, se dá pela necessidade de novas estratégias de combate, uma vez que este tipo neoplasia pode apresentar um padrão de metástase distinto em relação aos tumores convencionais (LYNCH et al., 2004; ZHANG, Z. et al., 2010; SHTIVELMAN et al., 2014).

A melhor compreensão dos mecanismos moleculares intrínsecos do NSCLC se torna essencial para a identificação de potenciais alvos genéticos e tratamento específico influenciando diretamente na taxa de sobrevida e/ ou cura dos pacientes devidamente tratados.

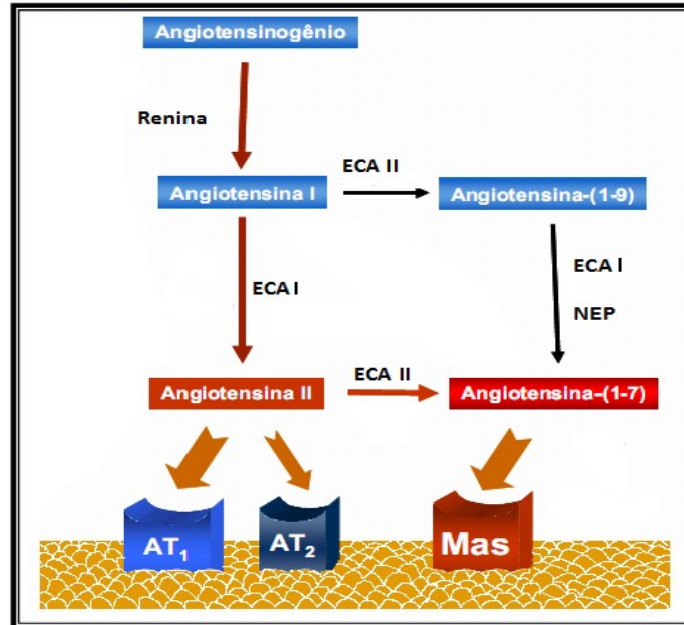
## **1.2. Sistema Renina Angiotensina**

O sistema renina angiotensina (SRA) é atualmente conhecido como um importante regulador fisiológico primário devido sua atuação central na regulação cardiovascular, além de atuar na homeostasia hidroeletrolítica e na regulação da

proliferação celular (FLEMING; KOHLSTEDT; BUSSE, 2005; IWAI; HORIUCHI, 2009; GALLAGHER et al., 2011; VERANO-BRAGA et al., 2012). Desde 1897, pesquisas envolvendo animais evidenciaram a existência de moléculas intrínsecas do organismo com capacidade de regular a pressão arterial (TIGERSTEDT; BERGMANN, 1897; MUÑOZ, J. et al., 1939; PAGE; HELMER, 1940). A partir desses estudos, os principais elementos regulatórios foram sendo caracterizados entre os quais se destacam a enzima renina e o produto de sua ação proteolítica, a angiotensina (PAGE; HELMER, 1940; BRAUN-MENENDEZ; PAGE, 1958).

A síntese dos peptídeos efetores do SRA (Figura 1) ocorre através de uma cascata de eventos da qual o angiotensinogênio, sintetizado e liberado na circulação pelo fígado, é degradado pela ação da renina plasmática ativa. Renina é uma enzima sintetizada e armazenada na circulação renal pelas células justaglomerulares das paredes das arteríolas aferentes do glomérulo renal na forma de uma pró-enzima, sendo esta liberada após alterações do padrão hemodinâmico e hidroeletrólítico do sistema circulatório como, alterações na reabsorção de Na<sup>+</sup>, aumento ou diminuição da pressão nos vasos ou ativação de adrenoreceptores. Após sua liberação, a pró-enzima é processada a uma pró-renina, e conseqüentemente em sua forma ativa, atuando sobre o angiotensinogênio e formando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I) (CAMPBELL, 2003; RIGATTO; BÖHLKE; IRIGOYEN, 2004; KAMIYAMA et al., 2013). Neste contexto, inserem-se as enzimas conversora de angiotensina I (ECA I) e a conversora de angiotensina II (ECA II), proteínas produzidas principalmente no epitélio pulmonar, inicialmente caracterizadas em humanos e roedores (DONOGHUE et al., 2000; WANG, L. et al., 2013; DE MELLO; FROHLICH, 2014). A enzima ECA I é uma proteína de membrana com sítios ativos expostos para o espaço extracelular, responsável por clivar Ang I, produzindo Ang II (COATES, 2003; DE MELLO; FROHLICH, 2014). Paralelamente, a enzima ECA II é responsável por degradar a Ang II originando Ang-(1-7), ou por clivar a Ang I no nonapeptídeo Ang-(1-9), que posteriormente é convertido em Ang-(1-7) pela ECA I e/ ou por neprilisin (NEP) (CASTRO, 2008; DE MELLO; FROHLICH, 2014).

**Figura 1** - Representação das principais vias de síntese do Sistema Renina Angiotensina (SRA). ECA - Enzima Conversora de Angiotensina; ECA II - Enzima Conversora de Angiotensina II; NEP - Neprilissina; AT- Receptor de Angiotensina II; MAS- Receptor de Angiotensina-(1-7)



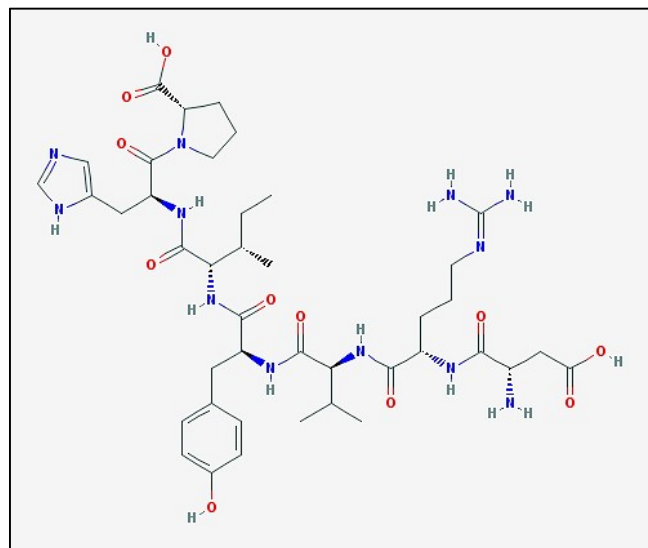
**Fonte:** Adaptação de Castro et al. (2008).

Na visão clássica do SRA, o octapeptídeo Ang II era considerado o hormônio efetor que, mediante sua ligação aos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> dos órgãos-alvos, é capaz de regular a homeostase cardiovascular, a pressão arterial e o equilíbrio hidroeletrolítico, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (DZAU; BURT; PRATT, 1988). Entretanto, sabe-se hoje que existem outros peptídeos menores que são gerados a partir da Ang I e da Ang II, dentre os quais se destaca a Ang-(1-7) (GEMBARDT et al., 2005).

Inicialmente, a Ang-(1-7) (Figura 2) era considerada um fragmento inativo do SRA, entretanto a concepção deste peptídeo constituído por sete aminoácidos (Asp-Arg-Val-Tir-Ile-His-Pro) foi sendo alterada devido aos avanços científicos e melhor entendimento deste sistema (SANTOS; FERREIRA, 2007; JIANG, F. et al., 2014). Após a descoberta do receptor Mas, estudos foram redirecionados para melhor compreensão da via de sinalização intracelular do peptídeo Ang-(1-7), até então considerado como elemento secundário (SANTOS, R. et al., 2003; OUDIT et al., 2008; VERANO-BRAGA et al., 2012). Vários estudos demonstraram que Ang-(1-7) tem a capacidade de inibir ECA e competir pela ligação aos receptores AT<sub>1</sub>,

impedindo assim a via de sinalização intracelular da Ang II (UEDA et al., 2000; CHANSEL et al., 2001; JIANG, F. et al., 2014). Ang-(1-7) destaca-se, principalmente, por ser uma molécula do SRA que contrabalança os efeitos deletérios da Ang II sobre o aparelho cardiovascular, apresentando amplos benefícios como vasodilatação, proteção do miocárdio, tratamento de arritmias e propriedade anti-hipertensiva (MUÑOZ, M. et al., 2010; BOIM; ZATZ; TEIXEIRA, 2011; WANG, L. et al., 2013; DE MELLO; FROHLICH, 2014; JIANG, F. et al., 2014).

**Figura 2** – Estrutura química do peptídeo vasoativo Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]



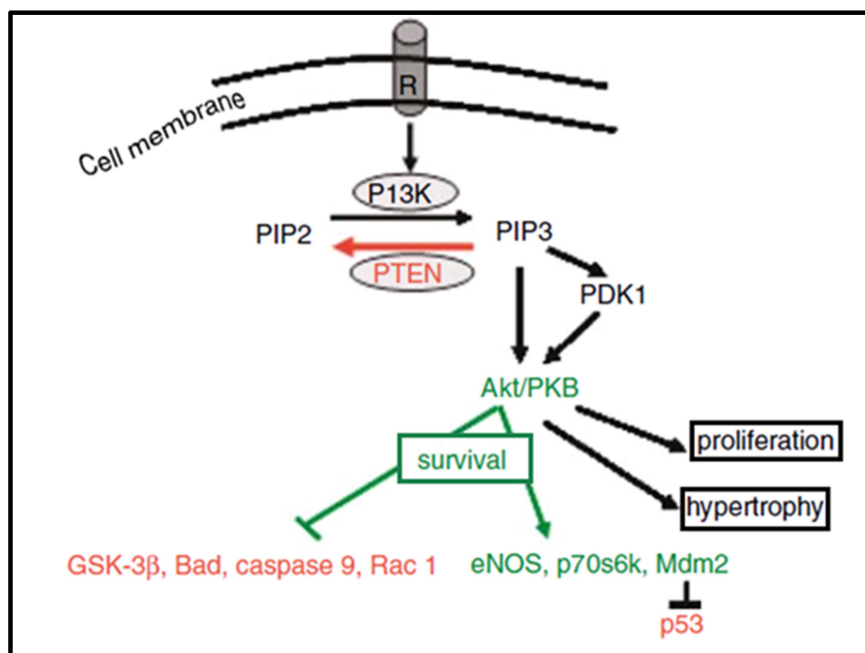
**Fonte:** pubchem.ncbi.nlm.nih.gov (2016).

O heptapeptídeo também afeta substancialmente o metabolismo de glicose, sugerindo potenciais benefícios para pacientes com diabetes (JIANG, F. et al., 2014). Aumentado a concentração circulante de Ang-(1-7), por infusão crônica ou expressão transgênica, ocorre amenização da hiperinsulinemia e resistência a insulina em ratos super-nutridos (GIANI et al., 2009; MARCUS et al., 2013), e maior sensibilidade à insulina e tolerância a glicose em ratos normoglicêmicos (SANTOS, S. et al., 2010). Além disso, em modelo de estudo de ratos com diabetes do tipo 2, o tratamento oral crônico com Ang-(1-7) induziu um efeito hipoglicemiante significativo, aumentou a sensibilidade à insulina e preveniu a hiperinsulinemia (SANTOS, S. et al., 2014). Evidências sugerem que a Ang-(1-7) facilite a captação de glicose através da regulação positiva da expressão do transportador de glicose tipo 4, sendo esse o principal transportador de glicose em humanos (TAKEDA et al., 2013).

A via de fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt) também é ativada pela Ang-(1-7) (SAMPAIO et al., 2007a; DIAS-PEIXOTO et al., 2008; MUÑOZ, M. et al., 2010; THAN; LEOW; CHEN, 2013). A ação da Ang-(1-7) sobre a via PI3K/Akt, pode parcialmente explicar os efeitos benéficos do heptapeptídeo sobre o funcionamento dos vasos sanguíneos e no metabolismo de glicose, uma vez que tal via facilita a sinalização induzida por insulina e a captação de glicose (SAMPAIO et al., 2007a; DIAS-PEIXOTO et al., 2008; GIANI et al., 2009; MUÑOZ, M. et al., 2010; THAN; LEOW; CHEN, 2013; SANTOS, R. et al., 2013).

Basicamente, a ativação da via PI3K/Akt (Figura 2) se dá em resposta a eventos fisiológicos e/ ou patológicos do organismo. Mediante ativação, a enzima fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) fosforila o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Os níveis celulares de PIP3 modulam a atividade da quinase 1 dependente de fosfoinosítídeos-3 (PDK-1) e posteriormente a atividade da proteína Akt/quinase B (Akt/PKB) (MOCANU; YELLON, 2007). Estudos apontam para a proteína fosfatase e tensina homóloga (PTEN) como sendo um modulador negativo de PI3K/Akt, interconectando-se à via através da reversão de PIP3 a PIP2, controlando assim a homeostasia do sistema (MOCANU; YELLON, 2007; OUDIT et al., 2008).

**Figura 3** - Via esquemática de PI3K/Akt



**Fonte:** Adaptação de Mocanu e Yellon (2007).

A ativação da via PI3K/Akt é de grande relevância devido sua capacidade de modular vários outros processos fisiológicos do organismo, além do metabolismo de glicose, como os mecanismos correlatos à proliferação e morte celular, hipertrofia, processo inflamatório e ciclo celular (BRADLEY; HAWLEY; BUNTING, 2002; VALENTINO; PIERRE, 2006; PAL; FIGLIN; RECKAMP, 2008). No tecido cardíaco de ratos, por exemplo, Akt apresenta elevada expressão e estaria relacionada com o crescimento celular e tecidual. Matsui e Rosenzweig (2005) evidenciam que existe uma relação direta entre expressão do gene de Akt e o volume do tecido cardíaco. St-Germain et al. (2004) demonstraram em seus estudos uma correlação entre a ativação de AKT e a ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), resultando no respectivo aumento da expressão da proteína ciclooxygenase-2 (COX-2), envolvida no processo hipertrófico mediado por inflamação.

O processo de apoptose também é regulado pela via de Akt. A proteína AKT fosforila fatores pró-apoptóticos como, por exemplo, a proteína Bad pertencente à família Bcl-2 (linfoma de célula B 2) (YUAN; YANKNER, 2000), a glicogênio sintetase quinase 3 beta (GSK-3 $\beta$ ) (CROSS et al., 2001), a caspase-9 e a família de fatores de transcrição da forquilha (FKHR) (VIVANCO; SAWYERS, 2002; KSIEZAK-REDING et al., 2003), os quais induzem a expressão de fatores pró-apoptóticos como o ligante Fas. Além disso, Akt também induz a ativação de proteínas reguladoras de genes com atividade anti-apoptótica, incluindo o elemento de resposta de ligação de cAMP (CREB) e o complexo I kappa B quinase (IKK), o qual regula positivamente NF- $\kappa$ B. Por sua vez, a proteína NF- $\kappa$ B é responsável pela transcrição de genes que promovem a sobrevivência celular, tais como Bcl-XL, inibidor de caspases e c-Myb (TESTA; BELLACOSA, 2001; FRESNO VARA et al., 2004; OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004).

Em relação ao câncer, evidências demonstram que a regulação negativa da via PI3K/Akt, suprime o desenvolvimento tumoral (DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000; MCCUBREY et al., 2012). Interessantemente, a proteína PTEN, um modulador negativo da via PI3K/Akt, se encontra mutada em diferentes tumores (SIMPSON; PARSONS, 2001; TROTMAN et al., 2007; SUZUKI et al., 2008). Estudos mostraram que a perda da função de PTEN, ou sua inativação por mutações, é um fato recorrente em diversos tumores, como o carcinoma pulmonar de pequenas células e o melanoma (DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000; SORIA et al., 2002; TANG et al., 2006; MOCANU; YELLON, 2007; OUDIT et al., 2008; CHENG; ZHANG, 2010;

STEELMAN et al., 2011). Segundo Tang et al. (2006), a diminuição na expressão da proteína PTEN está presente em 39-77% dos adenocarcinomas pulmonares, sugerindo que os baixos níveis de PTEN esteja associado ao mau prognóstico em pacientes com NSCLC. A proteína caseína-quinase 2 (CK-2), uma serina/treonina quinase altamente expressa em vários tipos de tumores malignos, é a principal enzima responsável pelo processo de fosforilação de PTEN, resultando em sua inativação, acúmulo de PIP3 e na ativação de AKT (KWON et al., 2004; RUZZENE; PINNA, 2010; PONCE et al., 2011). Neste contexto, a via PI3K/ AKT assume uma posição de destaque no processo de desenvolvimento tumoral, se tornando um atraente alvo terapêutico anticâncer (BRADLEY; HAWLEY; BUNTING, 2002; VALENTINO; PIERRE, 2006; PAL; FIGLIN; RECKAMP, 2008).

Fisiologicamente, os efeitos da Ang-(1-7) atuam sobre diversos órgãos. Além dos efeitos antiproliferativo, antifibrótico e antihipertrófico da Ang-(1-7) no coração (TALLANT; FERRARIO; GALLAGHER, 2005). Os rins, por exemplo, são conhecidos por serem importantes alvos do heptapeptídeo. Em condições normais, a Ang-(1-7) se encontra em concentrações comparáveis a Ang II (PENDERGRASS et al., 2006) mas ainda sim pode desencadear complexos efeitos neste órgão (SANTOS, R. et al., 2005). Estudos em modelo animal apontaram tanto o efeito antidiurético quanto o natriurético da Ang-(1-7), dependendo da condição fisiológica do animal, sendo sugerido que tais efeitos ocorram, provavelmente, devido à ativação cruzada dos receptores Mas e AT1, AT2 e V2 (receptor V2 da vasopressina) (PINHEIRO; SIMÕES E SILVA, 2004; SANTOS, R. et al., 2005; FERRARIO, 2006). Estes resultados mostram a necessidade de mais estudos para elucidar o mecanismo de ação da Ang-(1-7) na excreção de água e sais. Uma recente observação (SU; ZIMPELMANN; BURNS, 2006) de que o RNA mensageiro (mRNA) de Mas está presente em células tubulares proximais, nas quais a Ang-(1-7) inibe a fosforilação de proteínas quinases ativadoras de mitogênese (MAPK) induzidas por Ang II, evidenciam um putativo papel da Ang-(1-7) na proteção renal.

Ang-(1-7) é também conhecida como o principal peptídeo do SRA produzido no Sistema Nervoso Central (SNC). Sendo expressa em diversas regiões do cérebro, incluindo hipotálamo, hipocampo e amígdala, a Ang-(1-7) influencia diferentes funções cerebrais como aprendizado, memória e proteção contra isquemia cerebral (BECKER et al., 2007; ZHANG, Y. et al., 2008; PASSOS-SILVA; VERANO-BRAGA; SANTOS, 2013). De fato, Holy et al. (1992) evidenciaram que a

administração de Ang-(1-7) tinha efeitos psicotrópicos. Interessantemente, o hipocampo é a região com maior expressão do heptapeptídeo (METZGER et al., 1995) e estudos mostram que o *knockout* ou bloqueio de Mas, leva a um déficit na memória de reconhecimento de objetos, indicando a importância modulatória do eixo Ang-(1-7) /Mas no processo de aprendizado e memória (LAZARONI et al., 2012). Uma possível via molecular envolvida neste mecanismo é a síntese de óxido nítrico (NO), um fator crucial para memória de reconhecimento de objetos e que é modulado pela Ang-(1-7). Neste contexto, Yang et al. (2011) mostraram que a Ang-(1-7), via ativação de Mas, eleva os níveis de NO através da síntese neuronal de NO em neurônios catecolaminérgicos. Além disso, a Ang-(1-7) através da sua interação com o receptor Mas é capaz de aumentar a potenciação de longo prazo (*long-term potentiation* - LTP) no hipocampo e amígdala, sendo a LTP a base do aprendizado e memória (HELLNER et al., 2005). Um estudo recente apontou também que a infusão de Ang-(1-7) na região ventricular cerebral atenuava o déficit neurológico e diminuía o volume de infarto, através de um mecanismo paralelo da ação cérebro-protetora da Ang-(1-7) (JIANG, T. et al., 2012). Tal efeito era mediado pelas propriedades anti-inflamatórias via redução do estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias (JIANG, T. et al., 2012).

Além destes exemplos, sabe-se que a Ang-(1-7) é de extrema relevância em outros processos incluindo a reprodução (VAZ-SILVA et al., 2009; PRINGLE et al., 2011; REIS et al., 2011), o metabolismo de lipídeos (SANTOS, S. et al., 2010), e o processo fibrosante (PEREIRA et al., 2007; LUBEL et al., 2009; OSTERREICHER et al., 2009; WANG, K. et al., 2012). Fica evidente a importância biológica da Ang-(1-7), visto a diversidade de sistemas e vias moleculares sujeitas a sua modulação. Entretanto, a relevância dos efeitos deste peptídeo não se restringe aos processos fisiológicos do organismo. Estudos apontam para o potencial terapêutico da Ang-(1-7) no tratamento de neoplasias como, por exemplo, o câncer de pulmão.

### **1.3. O Sistema Renina Angiotensina e sua correlação com o câncer de pulmão: o papel da angiotensina-(1-7)**

Apesar da vasta quantidade de estudos buscando a compreensão dos efeitos fisiológicos e regulatórios dos componentes do SRA sobre o organismo, pesquisas apontam que vários tipos tumorais (cânceres de bexiga, cérebro, cólon, estômago,

fígado, pâncreas, pele, próstata, pulmão, rim e útero) também são modulados por estes elementos (ROSENTHAL et al., 2009; HANIF et al., 2010; GALLAGHER et al., 2011). Alguns dados recentes sugerem que além da angiotensina produzida sistemicamente, o ambiente tumoral possui também todos os componentes do SRA para a produção de angiotensina local, contribuindo significativamente na modulação do crescimento tumoral e da angiogênese (SANTOS; FERREIRA; SIMÕES e SILVA, 2008).

Inicialmente, um estudo conduzido por Romer et al. (1981) demonstrou que pacientes recém-diagnosticados com câncer de pulmão apresentavam uma redução significativa nos níveis séricos de ECA I em comparação com os indivíduos saudáveis. Essa observação foi corroborada por outros pesquisadores, que observaram baixos níveis de ECA I em pacientes com tumores no pulmão em comparação com indivíduos acometidos por outras doenças pulmonares ou outros tipos de tumores (MANSFIELD et al., 1984; SCHWEISFURTH et al., 1985; YUAN et al., 2013). Ainda, outros pesquisadores correlacionaram os baixos níveis de ECA I com um mau prognóstico da doença, maior taxa de recaída dos pacientes, bem como o aumento de metástase (ROMER et al., 1981; SIEFKIN et al. 1984; ROULSTON et al., 1986; VARELA et al., 1993; ZHANG, F. et al., 2010). Essa análise sugere que a diminuição da ECA I em pacientes com câncer de pulmão seja provavelmente um reflexo do aumento tumoral, visto que ocorre uma redução na quantidade de células epiteliais pulmonares, as quais são fonte primária da ECA I circulante. Interessantemente, outros estudos apontam um aumento na atividade da ECA I em pacientes com câncer dos brônquios submetidos a tratamentos quimioterápicos e/ou radioterápicos (SCHWEISFURTH et al., 1985; ROULSTON et al., 1986; VARELA et al., 1993; YUAN et al., 2013). A redução do volume tumoral em decorrência destes tratamentos resulta no aumento da produção da ECA I (SIEFKIN et al., 1984; ROULSTON et al., 1986), e conseqüentemente de seus metabólitos finais.

Além da ECA I, outras enzimas do SRA apresentam-se moduladas negativamente frente ao processo tumoral. Em relação ao câncer de pulmão, a enzima NEP vem sendo apontada como um importante fator na regulação do crescimento de células cancerígenas (SHIPP et al., 1991; COHEN et al., 1999, GALLAGHER et al., 2011). Caracterizada como uma zinco-metaloprotease, a NEP está presente em vários tecidos, mas no pulmão, particularmente, ela se encontra

em elevados níveis de expressão auxiliando a regulação da bronquiocstrição e no controle dos níveis dos peptídeos vasoativos do SRA (GALLAGHER; TALLANT, 2004; GALLAGHER et al., 2011).Entretanto, a utilização do cigarro pode inativar a NEP no pulmão, levando à acumulação de peptídeos mitogênicos no fluido brônquio alveolar, semelhantemente à situação observada em pacientes com câncer de pulmão devido à redução dos níveis dessa proteína (COHEN et al., 1999). Interessantemente, a inativação da NEP regula negativamente os níveis de Ang-(1-7), favorecendo assim o crescimento do tumor (GALLAGHER; TALLANT, 2004; SOTO-PANTOJA et al., 2009; GALLAGHER et al., 2011).

Um estudo aponta que a super-expressão de ECA II pode reduzir os níveis de Ang II e suprimir a proliferação de linhagens celulares de adenocarcinoma pulmonar humano (FENG et al., 2010). Ang-(1-7), gerada principalmente a partir de Ang II pela ECA II, Ang-(1-7) causa uma acentuada diminuição da síntese de DNA e da proliferação de células de câncer pulmonar humano, além de inibir a angiogênese tumoral *in vivo* pela redução do fator de crescimento vascular endotelial A (GALLAGHER; TALLANT, 2004; SOTO-PANTOJA et al., 2009).

Estudos em modelo murinho constataram que a infusão do heptapeptídeo reduziu a quantidade de hemoglobina, o fluxo sanguíneo e a atividade proliferativa local, corroborando com os indícios que a administração de Ang-(1-7) possa inibir o processo de angiogênese tumoral (MACHADO et al., 2000, FENG et al., 2011; GALLAGHER et al., 2011). Menon et al. (2007) evidenciaram através da administração de Ang-(1-7), uma redução no volume tumoral, de 30%, em xenoenxertos de câncer pulmonar humano em camundongos, sendo que nenhum efeito colateral (mudanças no peso do coração e do corpo, frequência cardíaca ou pressão sanguínea) decorrente do tratamento foi observado. Outros estudos realizados com linhagens celulares de câncer de pulmão humano (SK-LU-1, A549 e SK-MES-1) tratadas com Ang-(1-7), também demonstraram redução significativa no crescimento celular, decorrente da redução na taxa de síntese de DNA (COHEN et al., 1999; GALLAGHER; TALLANT, 2004; MCCOLLUM et al., 2012).

Entretanto, os estudos com Ang-(1-7) focaram-se, principalmente, na sua ação inibidora da proliferação de células tumorais ou de angiogênese, sendo que o papel do peptídeo no processo metastático ainda é pouco compreendido (NI, L. et al., 2012). Sendo o processo metastático uma das principais causas de mortalidade entre os pacientes com NSCLC (ISCLC, 2015), é de grande importância à

compreensão dos efeitos da Ang-(1-7) sobre os mecanismos de disseminação do tumor. A metástase tumoral consiste de uma intrincada cascata de etapas interdependentes, como as interações célula-célula e célula-matriz extracelular, degradação dos componentes da matriz, angiogênese, invasão e disseminação celular, as quais são reguladas por mecanismos extremamente complexos (FIDLER, 2002). Um elemento de extrema importância para a ocorrência da metástase são as metaloproteinases de matriz (MMP) envolvidas na degradação e remodelação da matriz extracelular (ECM) (EGEBLAD; WERB, 2002). Numerosos estudos apontam que a expressão de MMP é mediada por membros da família MAPK e pela via de PI3K/Akt (CHAKRABORTI et al., 2003; REDDY et al., 2003; LEE, S. et al., 2007; LOPEZ-BERGAMI et al., 2007; NI, L. et al., 2012). As proteínas intracelulares da família MAPK são caracterizadas por direcionar respostas celulares para vários estímulos como fatores de crescimento, citocinas e interações célula-matriz, regulando assim o crescimento celular e os mecanismos de apoptose, diferenciação e metástase (NI, L. et al., 2012). Além disso, a ativação de PI3K/Akt está diretamente relacionada com o desenvolvimento e progressão de vários tumores, uma vez que transdução dos sinais dessa via regulam a metástase celular pelo aumento na expressão de MMPs e promovendo a invasão tumoral (KIM et al., 2001; VIVANCO; SAWYERS, 2002).

Ni et al. (2012) mostraram *in vitro* um potencial efeito antimetastático da Ang-(1-7) avaliando o efeito do peptídeo no processo de migração e invasão da linhagem celular A549. Os resultados mostram que as células apresentaram uma redução da capacidade de migração e invasão quando expostas a Ang-(1-7) de maneira dose-dependente. Além disso, a inibição da expressão de MMP-2 e MMP-9 pela Ang-(1-7) foram relacionadas à inativação de PI3K/Akt e MAPKs. Outro estudo (CHIEN et al., 2009) também relacionou o processo metastático em célula de NSCLC com a via PI3K/Akt. Neste contexto, Ni et al. (2012) sugerem que Ang-(1-7) age de maneira importante na regulação do microambiente tumoral, principalmente através da inativação das vias de sinalização de PI3K/Akt e MAPKs.

A partir das informações apresentadas, fica evidente a importância do SRA para o organismo, destacando-se o eixo Ang-(1-7) – receptor Mas no controle do crescimento do câncer de pulmão e do processo de metástase, representando assim uma promissora estratégia no combate ao câncer.

#### **1.4. Participação das moléculas de adesão nos processos de carcinogênese e metástase tumoral**

A ocorrência de metástase cerebral em 25-40% dos pacientes diagnosticados com NSCLC, logo nos dois primeiros anos após o diagnóstico, pode ser considerado um grande complicador da doença. Entretanto, devido ao quadro de saúde debilitado, muitos pacientes com metástase cerebral não são elegíveis para cirurgia ou radio cirurgia. Além disso, a utilização de quimioterapia sistêmica como tratamento de metástase cerebral é controversa devido à natureza impenetrável da barreira hematoencefálica, sendo que as taxas de resposta ao tratamento variam de 15-30% (DEMPKE et al., 2015). Neste contexto fica evidente a necessidade de um melhor entendimento e novas estratégias de tratamento voltado aos processos celulares envolvidos na metástase.

Dentre os elementos facilitadores da metástase temos as interações celulares (célula-célula, célula-matriz) que facilitam a adesão das células tumorais a pontos inespecíficos e o processo metastático. Atualmente, a inibição destas interações representa um interessante alvo terapêutico para a atenuação de metástase, assim como para a regressão tumoral e no processo de angiogênese (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010).

As integrinas, por exemplo, são glicoproteínas transmembranas grandes e complexas, estruturadas por duas cadeias diferentes,  $\alpha$ - e  $\beta$ -subunidade, as quais formam um heterodímero não covalente (HYNES, 2002; MORGAN et al., 2007). Responsáveis por mediar a adesão celular, elas se ligam diretamente aos componentes da matriz extracelular (ECM), tais como fibronectina, laminina e colágeno, proporcionando assim a ancoragem necessária para a migração e invasão celular (HYNES, 2002; MORGAN et al., 2007). As integrinas também estão envolvidas na sinalização intra e extracelular, regulando a proliferação celular, mecanismos de sobrevivência e angiogênese, sendo estes processos de extrema importância para a progressão tumoral. Desgrosellier e Cheresh (2010) relacionaram os níveis de expressão de integrinas com os resultados patológicos, tais como metástase ou a sobrevida dos pacientes, identificando assim várias integrinas possivelmente envolvidas na progressão do câncer. A expressão de diferentes integrinas em células tumorais foi relacionada com a progressão metastática em pacientes com melanoma, carcinoma da mama, próstata, pâncreas e câncer do

pulmão (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010). Os resultados mostram um papel fundamental das integrinas na evolução do câncer e por isso elas têm se tornando alvos terapêuticos atrativos para novas estratégias focadas tanto na diminuição do tumor, quanto na repreensão da metástase.

Outra proteína de interesse é a molécula de adesão da célula epitelial (EPCAM – epitelial *cell adhesion molecule*), uma glicoproteína identificada como um marcador para o câncer, devido à sua elevada expressão na rápida proliferação tumoral de origem epitelial (MAETZEL et al., 2009). Em condição fisiológica, os epitélios expressam EPCAM em um nível variável, mas geralmente inferior ao que é produzido pelas células tumorais (MAETZEL et al., 2009). Inicialmente, EPCAM foi descrita como uma molécula de adesão célula-célula, entretanto estudos posteriores revelaram um papel mais versátil para a proteína, incluindo processos de sinalização, migração, proliferação e diferenciação celular (MAETZEL et al., 2009). Estudos apontam que dependendo do tecido de origem, EPCAM pode agir de forma oncogênica, promovendo a proliferação celular, motilidade, carcinogênese e metástase, ou de forma a suprimir a progressão do câncer (VAN DER GUN et al., 2010), mas os mecanismos responsáveis pelas atividades divergentes de EPCAM em diferentes contextos ainda não foram elucidados. A maioria dos estudos envolvendo EPCAM está focada em seu efeito na proliferação celular (LITVINOV et al., 1994; CHAVES-PEREZ et al., 2012) ou na capacidade de invasão das células tumorais (SANKPAL et al., 2009). Outros estudos utilizaram EPCAM como um marcador de superfície para a identificação de células de iniciação tumoral (NAGRATH et al., 2007; YAMASHITA et al., 2009; TERRIS et al., 2010). A diversidade biológica de EPCAM no processo tumoral faz com que a mesma seja, também, um importante alvo de pesquisas.

Além dessas, o complexo de Junções Oclusivas (TJ, *tight junctions*) consiste em um dos complexos juncionais mais importantes de células endoteliais e epiteliais (RUNKLE; MU, 2013). As proteínas TJ podem ainda ser subdivididas em proteínas integrais de membrana e proteínas citoplasmáticas, dentre as quais se destaca a ocludina, uma proteína de membrana, e as proteínas adaptadoras citoplasmáticas da zona de oclusão (ZO, *zonula occludens*), designadas ZO-1, -2, e -3, responsáveis por ligar as proteínas de membrana ao citoesqueleto de actina. Coletivamente, as TJ apresentam função de barreira celular, regulando a permeabilidade de soluto entre células adjacentes e controlando a difusão lateral de proteínas inseridas na

bicamada lipídica. A ocludina foi a primeira proteína transmembrana identificada no complexo das TJs, e desde então muitas pesquisas foram conduzidas para determinar sua função (TORRES-FLORES; ARIAS, 2015). Apesar de não serem essenciais para a formação das TJs (SCHULZKE et al., 2005), as ocludinas são capazes de regular o transporte de alguns pequenos íons pelo espaço paracelular (YU; TURNER, 2008) e podem estar envolvidas tanto na biogênese de vesículas endocíticas quanto na organização de domínios especializados de membrana semelhante às TJs (SÁNCHEZ-PULIDO et al., 2002). Em um estudo com RNA de interferência, a expressão de ocludina foi silenciada em células epiteliais ocasionando um comprometimento da ativação da GTPase RhoA, sugerindo que ocludina também esteja relacionada a transdução de sinais (YU, A. et al., 2005). Por sua vez, ZO-1 foi a primeira proteína citoplasmática descrita do complexo proteico de TJ, sendo de extrema importância para a montagem das junções (UMEDA et al., 2004; MCNEIL et al., 2006; RODGERS et al., 2013) e atuando como suporte citoplasmático para outras proteínas sinalizadoras, como proteína quinase C (PKC), GTPases Rho, Rab, e Ras, envolvidas na transdução de sinal correlato às TJs (TORRES-FLORES; ARIAS, 2015).

Apesar do enfoque tradicional dado pelos pesquisadores à função de barreira celular, novas tendências apontam para a participação das TJ na proliferação e transformação celular, além de suprimir a metástase (RUNKLE; MU, 2013). Ocludina emergiu como um mediador crítico para a transformação celular desde a descoberta de que é transcricionalmente reprimida a partir da expressão constitutiva de Raf-1 (Raf-1 Proto-Oncogene, Serina/Treonina Quinase), e sua subsequente re-expressão foi suficiente para resgatar o fenótipo transformado, sugerindo que ocludina seja um proteína anti-transformação (LI; MRSNY, 2000; WANG, Z. et al., 2007; RUNKLE; MU, 2013). Outro estudo mostra que ocludina é epigeneticamente silenciada por hipermetilação da região promotora em células de melanoma murino e, uma vez forçada a expressão de ocludina, observou-se redução na taxa de migração das células (OSANAI et al., 2006). Uma vez estabilizada a expressão de ocludina em células de melanoma e câncer de mama, seguido de injeção das mesmas no tórax (posição crânio-lateral) e no tecido adiposo mamário, respectivamente, resultou na redução no tamanho da metástase pulmonar (OSANAI et al., 2006). Além disso, um estudo conduzido por Phillips et al. (2008), notou que a perda de ocludina, aumentou as taxas de proliferação celular. As proteínas ZO têm sido descritas principalmente

nas TJs, mas também foram encontradas no núcleo celular, onde diversos eventos regulatórios acontecem (TAPIA et al., 2009; GONZALEZ-MARISCAL et al., 2009). Matter e Balda (2000) relacionaram proteínas TJ à regulação do ciclo celular mediante a descoberta da proteína de interação com ZO-1 chamada ZONAB (*ZO-1-associated nucleic acid-binding protein*). Este estudo mostrou interações da ZONAB com proteínas regulatórias de promotores do ciclo celular, sendo que o silenciamento de ZONAB reduziu as taxas de proliferação, enquanto a superexpressão aumentou a densidade celular. Neste contexto, o uso do modelo de estudo celular é de extrema valia para melhor compreensão da participação das proteínas de TJs além dos processos de regulação da barreira celular.

Existe ainda uma gama de proteínas inerentes ao mecanismo de adesão que podem ser relacionados com o câncer, como por exemplo, a caderina e catenina, responsáveis pela formação do complexo E-caderina/ $\beta$ -catenina. Este complexo já foi bem explorado e revisado por vários autores, quanto a sua relação com a progressão, invasão e prognóstico em diversos tipos tumorais como câncer pulmonar, câncer de estômago e câncer de laringe (BREMNES et al., 2002; CHARALABOPOULOS, et al., 2004; MITTARI et al., 2005; CHAN, 2006; AL MOUSTAFA et al., 2008). Neste contexto, fica evidente a necessidade de se explorar o potencial terapêutico existentes nas interações biológicas envolvendo moléculas de adesão, como opção de suprimir o crescimento do volume tumoral e impedir o processo metastático em pacientes acometidos pelo câncer.

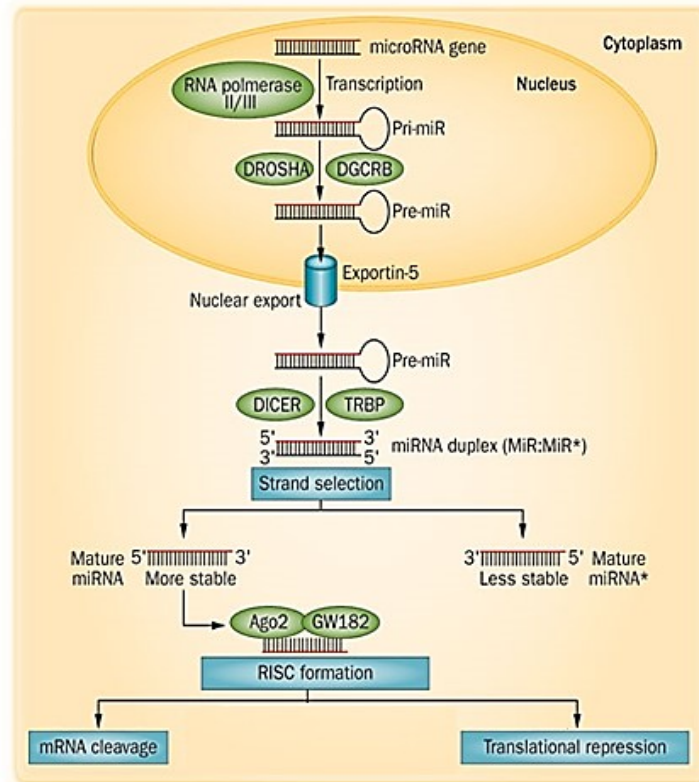
### **1.5. MicroRNAs: biogênese, função e regulação do processo tumoral**

Dentro do contexto do equilíbrio sistêmico de um organismo, a homeostase celular é necessária. Para tal, a regulação fina da expressão gênica é ponto crucial e esta pode se dar por múltiplos mecanismos a nível transcricional, pós-transcricional e/ ou pós-traducional. Dentre os elementos envolvidos com este equilíbrio, os microRNAs (miRNAs) vêm sendo apontados como moléculas regulatórias de grande interesse científico (WINTER et al., 2009).

Apesar de se tratar de uma temática ainda pouco compreendida dentro do estudo de genomas (MATTICK et al., 2010), sabe-se que os miRNAs são pequenas moléculas de ácido ribonucleico (RNA), constituídos de uma sequência de 18-25 nucleotídeos dispostos em fita simples e que não codificam proteínas (WINTER et

al., 2009; SUBRAMANIAM et al., 2013). Os miRNAs regulam a expressão gênica inibindo a tradução ou degradando o mRNA alvo, através de um mecanismo caracterizado como RNA de interferência (RNAi) (BARTEL, 2004; WINTER et al., 2009). A biogênese dos miRNAs (Figura 3) se inicia com a transcrição do seu gene realizada pela RNA polimerase II, gerando uma molécula de miRNA primário (pri-miRNA) que pode conter um ou múltiplos miRNAs (CALIN et al., 2004). Os pri-miRNAs apresentam uma estrutura em forma de grampo (*hairpin*) que é clivada ainda no núcleo celular pela enzima Drosha (caracterizada como uma RNA polimerase III), gerando uma molécula precursora do miRNA maduro denominada pré-miRNA (BARTEL, 2004; WINTER et al., 2009). Esses pré-miRNAs são então transportado rapidamente ao citoplasma pelo complexo Exportina5/Ran-GTP (PINEAU et al., 2010). No citoplasma, os pré-miRNAs são processados pela enzima Dicer, gerando um duplex de RNA (CHENDRIMADA et al., 2005). Na maioria das vezes uma das fitas do duplex se transforma no miRNA maduro e a outra fita é degradada (LIU; OLSON, 2010). O produto não degradado é então incorporado pelo Complexo Indutor de Silenciamento de RNA (RISC - *RNA-induced silencing complex*) e é então direcionada por esse complexo a sequências complementares na porção 3'- não traduzidas (3'-UTR) do mRNA. Esse pareamento desencadeia o mecanismo de RNAi (CARTHEW; SONTHEIMER 2009).

**Figura 4-** Esquema de biogênese e atuação dos miRNAs



**Fonte:** Adaptação de Szabo e Bala (2013).

Os miRNAs podem ser encontrados nos éxons, íntrons ou regiões intergênicas do genoma de animais e de plantas (LI et al., 2006), e têm sido relacionados a uma grande variedade de processos biológicos tais como proliferação celular, apoptose (CHENG et al., 2005), resposta ao estresse (DRESIOS et al., 2005), cânceres (KIM et al., 2014), desenvolvimento de órgãos, entre outros. Interessantemente, os miRNAs representam uma das classes de moléculas regulatórias mais abundantes em organismos multicelulares (BARTEL, 2004), e análises preliminares de bioinformática sugerem que um único miRNA pode regular inúmeros mRNAs alvos (SELBACH et al., 2008), ressaltando a importância da participação dessas pequenas moléculas na regulação gênica.

Nos últimos anos, os miRNAs vêm sendo extensivamente estudado nos processos tumorais. Entre as várias pesquisas nessa área, estudos apontam a importância dessas moléculas na modulação do crescimento tumoral, invasão, angiogênese e evasão à imunidade (HAYES et al., 2014). A relação entre a variação nos níveis de miRNAs e o processo tumoral foi inicialmente descrita em leucemia linfocítica crônica (CLL) e desde então um crescente número de investigações

apontam que miRNAs podem atuar como oncogenes (oncomirs) e/ou supressores tumorais. Estudos envolvendo câncer de pulmão humano *in vivo* e *in vitro*, mostraram que muitos miRNAs estão geralmente reprimidos quando comparados ao tecido normal, como por exemplo, os miRNAs let-7 (HE et al., 2009), miR-15a, miR-16 (SHEN et al., 2010), miR-34a (BANDI et al., 2011), miR-34b (WANG, L. et al., 2013), miR-125 (JIANG et al., 2011), miR-155, miR-192 e miR-486 (PENG et al., 2013), enquanto outros são super-expressos, como o miR-21 (SUN et al., 2013; ZHANG, X. et al., 2014), o miR194 (WU et al., 2013) e o miR-186 (HUANG et al., 2013). Através da caracterização funcional de miRNAs novas oportunidades de terapia e diagnóstico têm sido exploradas, principalmente devido ao fato de miRNAs, associados a câncer, serem passíveis de detecção em fluidos biológicos, agindo como biomarcadores, o que permite um monitoramento, menos invasivo, do quadro clínico do paciente.

Dentre os miRNAs, o miR-21 é reconhecido como o principal elemento proveniente da transcrição de miRNAs, apresentando alta expressão em diversos tumores sólidos e se relacionando aos processos de proliferação celular, diferenciação, apoptose, crescimento tumoral, invasão, metástase e de resistência às drogas (SELCUKLU et al., 2009; KRICHEVSKY; GABRIELY, 2009; LI, Y. et al., 2010; MOORE; ZHANG, 2010; ROSSI et al., 2010; SHI, G. et al., 2010; LI, S. et al., 2012). Yan et al. (2008) reportaram que a super-expressão do miRNA-21 estava correlacionada com características clinico-patológicas do câncer de mama, assim com o estágio tumoral avançado, metástase nos linfonodos e condições desfavoráveis de sobrevivência do paciente. Em células de câncer de estômago, o miRNA-21 demonstrou regular a radio-sensibilidade, possivelmente pela direta modulação da expressão de PTEN (LIMA et al., 2011), além de ser associado ao grau de diferenciação do tecido tumoral (HUANG et al., 2013). Um estudo conduzido por Schuster et al. (2008) com câncer colorretal mostrou que a super-expressão de miRNA-21 está associada com piores prognósticos e menor taxa de resposta aos quimioterápicos. Outros estudos apontam para a correlação entre a alta expressão do miRNA-21 em câncer pulmonar com a presença de metástase nos linfonodos e as taxas de sobrevivência (MARKOU et al., 2008; ZHANG, J. et al., 2010; WEI et al., 2011). Entretanto, a inibição do miRNA-21 em cultura de célula A549 não modificou a taxa de crescimento ou morte celular (CHENG et al., 2005).

Interessantemente, estudos do desenvolvimento de modelos vertebrados apontam que a expressão de miR-21 foi detectada logo nas primeiras 12 horas de desenvolvimento do embrião (CHEN et al., 2005; KUMARSWAMY et al., 2011). Em outro estudo com peixes (RAMACHANDRA et al., 2008) foi mostrado que os níveis de expressão do miR-21 e Stat3, o qual é um fator de transcrição regulador do miRNA-21 (LOFFLER et al., 2007), elevaram-se significativamente durante a ativação gênica embrionária. Desta forma, é proposto que o miRNA-21 atua de maneira importante na degradação de mRNAs herdados matematicamente, através de um mecanismo não tão bem compreendido até então (KUMARSWAMY et al., 2011). Além disso, o miR-21 tem sido apontado como elemento atuante na morfogênese ramificada (HAYASHI et al., 2011), sendo este um processo de desenvolvimento basal na formação de vários órgãos, incluindo pulmões, rins e glândulas exócrinas. Neste contexto, fica evidente a importância do miRNA-21, uma vez que o mesmo atua de maneira crucial em diversos processos biológicos.

Porém, ainda são muitas as particularidades moleculares que precisam ser elucidadas sobre os miRNAs, como por exemplo, de que forma eles são transportados nos fluidos corpóreos e porque alguns miRNAs são encontrados em regiões distantes de onde foram sintetizados. Uma possível explicação seria: através de vesículas microscópicas, com diâmetro de 40-100 nm, denominadas de exossomos (COCUCCI et al., 2009). O termo foi primeiramente utilizado em 1970, e desde então tem recebido bastante atenção dos pesquisadores (QIN; XU, 2014). Diversas linhagens celulares liberam exossomos *ex-vivo* (células neuronais, fibroblastos, adipócitos, células do epitélio intestinal e células tumorais) e através de vários estudos foi observado que a liberação dessas microvesículas está intimamente relacionada com a resposta imune, coagulação, inflamação e angiogênese (SKOG et al., 2008; AHMAD et al., 2010). Mittelbrunn et al. (2011) encontraram miRNAs em leite materno, sendo transportados por exossomos, ao longo dos seis primeiros meses de lactação, demonstrando a alta capacidade de disseminação dos miRNAs por exossomos através dos fluidos corpóreos. Além disso, Valadi et al. (2007) demonstraram que alguns miRNAs são detectados em maior quantidade nos exossomos do que nas células de origem, sugerindo que alguns miRNAs são especificamente destinados a serem transferidos pelos exossomos. Nesse contexto, a comunicação célula-célula, em condições normais ou patológicas, se mostra bastante complexa podendo ocorrer através da transferência

de RNA por exossomos, além de maneiras já descritas como eventos mediados por receptores químicos, contato direto célula-célula, e sinapses celulares (VALADI et al., 2007).

Frente aos avanços científicos na área, fica evidente a importância dos miRNAs, não apenas no metabolismo da célula onde é produzido, mas também no funcionamento do organismo como um todo, já que estas pequenas moléculas de RNA não-codificantes podem ser encontradas e/ou enviadas a todo o organismo, reforçando seu potencial de uso como biomarcadores visando a uma rápida detecção da presença de um quadro patológico, além de seu uso na classificação de diferentes tipos de câncer e, também, como um aliado na construção e desenvolvimento de ferramentas terapêuticas (LIU et al., 2011).

Vários miRNAs se mostraram promissores em terapia combinada com outros tratamentos. No caso de câncer colorretal (CRC), o miR-147, por exemplo, aumentou a sensibilidade à gefitinib após a indução da transição mesênquima-epitelial (MET) (LEE, C. et al., 2014). Ruzzo et al. (2012) mostrou que super-expressão de let-7a restaurou a sensibilidade à tratamentos anti-EGFR em pacientes com CRC. Outro exemplo seria a ação do miR-192, o qual se apresenta como um sensibilizador das células de CRC ao metotrexato, sendo que o tratamento combinado do miRNA com o fármaco apresentou maior eficácia em relação a outros tratamentos (SONG et al., 2008). Assim como os exemplos relatados em estudos de CRC, é necessário a compreensão e desenvolvimento de estratégias similares de terapêutica do miRNA, visto a grande importância destas moléculas associado impacto epidemiológico mundial inerente ao câncer de pulmão.

### **1.6. O modelo celular de investigação científica**

A tecnologia da cultura celular marca uma grande mudança no campo da pesquisa durante as últimas décadas, visto sua versatilidade de estudos e os diversos ensaios aos quais se aplicam (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2014). A história desta técnica data desde o século XIX, quando Wilhelm Roux conseguiu manter células vivas do disco neural de embriões de galinha em solução salina por alguns dias (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2014). Em 1907, Ross Granville Harrison publicou um artigo apresentando uma metodologia para cultura de células nervosas com a finalidade de estudo da fisiologia e comportamento das células

animais em ambiente homeostático e em situações de estresse (HARRISON, 1907; RYAN, 2008).

Para isso, Harrison superou alguns desafios existentes na cultura básica e desenvolveu uma técnica reproduzível. A técnica consistia da fragmentação do tubo neural de embrião de sapo e da transferência de uma gota da linfa para uma lamínula. Uma vez coagulada a linfa, a lamínula era colocada sobre uma lâmina escavada gerando assim uma gota de cultura suspensa. Esta técnica já era amplamente usada por microbiologista para o estudo de bactérias, entretanto a aplicação da mesma para cultura de tecidos foi um sucesso (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2014). Desde então a técnica foi sendo utilizada, adaptada e aperfeiçoada, até que a partir de 1940, com o desenvolvimento de um meio de cultura sintético para células vegetais e animais, a cultura celular despontou possibilitando a consolidação desta metodologia científica (WHITE, 1946; FISCHER, 1947; FRESHNEY, 2006; RYAN, 2008).

Earle et al. (1943) estabeleceram a primeira linhagem celular, sendo essa, fibroblastos adaptados ao crescimento indefinido em meio de cultura. Em 1951, uma paciente chamada Henrietta Lacks foi diagnosticada com câncer cervical a partir de uma biópsia. Uma amostra das células foi enviada para análise e, após o cultivo, observou-se que a linhagem celular era extremamente resistente e se proliferava em intervalos regulares de vinte horas (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2014). Esta nova linhagem celular denominada HeLa (*Henrietta Lacks*) foi então utilizada para o desenvolvimento da vacina Salk, e constituiu um dos recursos mais importantes no estudo do câncer (SHARRER, 2006). Em 1954, culturas de células foram utilizadas para produzir uma vacina veterinária contra febre aftosa (WU et al., 2010). Harris e Watkins (1965) produziram as primeiras células híbridas de mamíferos, pela recombinação de células humanas e de ratos, utilizando um vetor viral. Em 1975, Georges Kohler e Cesar Milstein produziram os primeiros anticorpos monoclonais, o que os rendeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1984 (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2014). No ano de 1973, Graham e Van der Eb introduziram DNA em cultura de células mamíferas (GRAHAM; VAN DER EB, 1973) e a base para o desenvolvimento de técnicas para incorporação de genes no genoma celular (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2014). Em 1992 foi criado o banco de células denominado Associação Americana de Tipo de Cultura (*American Type Culture Association*) (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2014), até que no final dos anos 90

aconteceu o maior sucesso científico da época: a clonagem de um mamífero (WILMUT et al., 1997). Neste contexto, as culturas celulares se estabeleceram como uma importante ferramenta para a investigação científica e que vem contribuindo com o desenvolvimento da biotecnologia. Além disso, a crescente tendência de reduzir, ou até substituir, a utilização de animais como modelo experimental, favoreceu ainda mais a utilização do modelo celular visando a melhor compreensão dos mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos do organismo (HALL, 1988; LINDENBACH et al., 2005; LELAND; GINOCCHIO, 2007; WU et al., 2010).

Através dos avanços advindos da bioquímica, biologia molecular, biologia celular e bioinformática, expandiram-se as aplicações científicas das culturas celulares (LI, Y. et al., 2010). Correlatos a investigação científica que se embasa na elucidação de mecanismos moleculares, a utilização do cultivo celular subsidia estudos sobre as atividades intracelulares que incluem a transcrição do DNA, processamento de RNA, síntese de proteínas marcadas radioativamente ou por fluorescência, técnicas de imobilização, linhagens celulares específicas, ciclo celular, caracterização, proliferação, diferenciação, apoptose, etc (HOFFMAN et al., 1998; ANDREEFF et al., 2000; KOURTIS; TAVERNARAKIS, 2009; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2014). Nos campos da genômica e proteômica, as culturas celulares podem ser exploradas para estudos de expressão gênica, infecção, transformação celular, imortalização, vias metabólicas, e interações celulares como morfogênese, proliferação e adesão (ANDREEFF et al., 2000; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2014). Além disso, a tecnologia de cultura celular se tornou uma ferramenta indispensável em determinadas áreas de estudo como virologia, farmacologia, toxicologia e oncologia. Em virologia, a cultura celular viabilizou o isolamento de vírus, facilitou o controle de contaminação por meio de antibióticos e equipamentos estéreis, e ajudou a diminuir o uso do modelo animal (LINDENBACH et al., 2005; LELAND; GINOCCHIO, 2007). As aplicações de culturas celulares na farmacologia e toxicologia visam testar o efeito de diferentes drogas, interações do tipo droga-receptor, fenômenos de resistência, citotoxicidade, mutagênese, carcinogênese, entre outros (FRIEDRICH et al., 2007; SMALLEY et al., 2008; LOVITT et al., 2014; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2014). Na oncologia, a utilização de culturas celulares facilita a elucidação do processo tumoral uma vez que as pesquisas de expressão e regulação gênica (CRACKOWER et al., 2002; MARSIT et al., 2005; TANG et al., 2006; MOCANU; YELLON, 2007; YAN et al.,

2008; CHENG; ZHANG, 2010; LIMA et al., 2011), vias metabólicas e de transdução de sinal (DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000; KIM et al., 2001; BRADLEY; HAWLEY; BUNTING, 2002; FERRAJOLI et al., 2006; ALVES, 2008; MCCUBREY et al., 2012), identificação de potenciais alvos terapêuticos (VALENTINO; PIERRE, 2006; PAL; FIGLIN; RECKAMP, 2008; FUKUOKA et al., 2011; DIMOU; PAPADIMITRAKOPOULOU, 2014) e desenvolvimento de terapias anticâncer (LINDEE, 2007; CRUZ et al., 2009) podem ser realizadas de maneira precisa e isoladamente, viabilizando um estudo mecanístico de elementos centrais na patologia.

Desta maneira, considerando-se as vantagens do modelo de estudo que se embasa na cultura de células, o presente projeto procurou investigar o efeito modulador do peptídeo vasoativo Angiotensina-(1-7) sobre a linhagem celular A549 e a atuação do microRNA 21-5p no processo tumoral pulmonar.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Analisar os efeitos bioquímicos, fisiológicos e moleculares do tratamento com o peptídeo vasoativo Angiotensina-(1-7) em linhagem celular tumoral A549 e a atuação do microRNA 21-5p.

### 2.2. Objetivos específicos

- Realizar ensaios de viabilidade celular utilizando-se a concentração  $10^{-7}$  M do heptapeptídeo angiotensina-(1-7), corroborando dados da literatura;
- Estabelecer os quatro grupos de culturas celulares: A549 controle, A549 tratamento com Ang-(1-7), A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p (que superexpressa o miRNA-21-5p);
- Investigar aspectos da fisiologia e bioquímica das células A549, tais como mensuração de lactato, pH e tempo de duplicação das culturas, em cada um dos grupos estudados;
- Analisar o padrão transcricional de genes correlacionados ao processo tumoral e aos mecanismos de adesão e migração, para cada grupo celular analisado;
- Quantificar o potencial invasivo e migratório dos grupos celulares;
- Mensurar a atividade de MMP-2 e MMP-9 em cada um dos grupos celulares estudados.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Técnicas usuais de biologia molecular foram baseadas nas metodologias descritas em Sambrook et al. (1989) e Ausubel et al. (1995).

#### 3.1. Cultura celular e tratamento

Culturas da linhagem celular A549 (*American Type Culture Collection*, ATCC: CRM-CCL-185™), oriundas de carcinoma de tecido pulmonar, foram crescidas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> com meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12, Thermo Fisher Scientific Inc.) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) e 0,1% de antibiótico (Penicilina e Estreptomicina, Thermo Fisher Scientific Inc.). As culturas celulares foram mantidas em estufa, a 37°C e atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub>.

Para a realização dos ensaios,  $1,5 \times 10^5$  células foram semeadas em garrafas de cultura e crescidas na ausência (grupo controle) ou presença do heptapeptídeo Ang-(1-7) (Bachem®) na concentração final de  $10^{-7}$  M (grupo tratamento). Em intervalos regulares de 24 horas, o meio de cultura de ambos os grupos era substituído. As células foram incubadas e crescidas até atingir a confluência de 90%, e em seguida utilizadas nas análises celulares e moleculares.

#### 3.2. Ensaio de viabilidade celular

O potencial citotóxico do heptapeptídeo Ang-(1-7) em células A549 foi avaliado pelo ensaio de viabilidade celular, também conhecido como MTT (MOSMANN, 1983). Esta técnica quantifica a atividade mitocondrial, através da redução de sais amarelos de tetrazólio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) pela enzima desidrogenase succínica, formando cristais azuis (formazan) intracelularmente. Posteriormente os cristais são dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) e realiza-se a quantificação em espectrofotômetro a 570 nm (MOSMANN, 1983; LOBNER, 2000). Baseado em informações disponíveis na literatura (SAMPAIO et al., 2007; VERANO-BRAGA et al., 2012), adotou-se a concentração de Ang-(1-7) a  $10^{-7}$  M para a realização das análises, e o efeito citotóxico da mesma foi avaliado em diferentes intervalos.

Para os ensaios,  $1,5 \times 10^4$  células foram cultivadas em microplaca de 96 poços e incubadas por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ . Em seguida, o meio de cultura foi substituído em intervalos regulares de 24 horas (24, 48 e 72 horas), contendo ou não o heptapeptídeo na concentração final de  $10^{-7}$  M. As células foram então incubadas a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Após os respectivos intervalos de incubação, foi realizado o ensaio de viabilidade celular e para isso o meio de cultura foi substituído por alíquotas novas contendo o reagente MTT (Sigma - Aldrich<sup>®</sup>), na concentração de 5 mg/ml. As culturas foram então incubadas por 2 horas, a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Em seguida, o meio de cultura contendo MTT foi removido e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de DMSO às células; a placa foi novamente incubada por 2 horas, a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ , para dissolução dos cristais formados intracelularmente. Ao final da incubação, analisou-se a absorbância em leitor de microplacas *EZ Read 400 Microplate Reader* (Biochrom) pelo ensaio de ELISA no comprimento de onda de 570 nm.

### 3.3. Análises bioquímicas e fisiológicas

#### 3.3.1. Avaliação dos níveis de Lactato e pH

Para a realização dos ensaios,  $1,5 \times 10^5$  células, dos diferentes grupos celulares avaliados, foram semeadas em garrafas de 75  $\text{cm}^2$  e crescidas até a confluência de 90%, enquanto o meio de cultura foi trocado em intervalos regulares de 24 horas. Alíquotas dos sobrenadantes foram coletadas 24 horas após o início do ensaio e, novamente, quando as células atingissem 90% de confluência. Analisando-se os sobrenadantes, foi possível avaliar possíveis alterações bioquímicas no metabolismo celular, comparando-se os diferentes grupos celulares avaliados. Para tal investigação, os níveis de lactato e variação de pH foram mensurados. Fitas *ColorpHast<sup>®</sup> pH Strips 5-10* (EMD Millipore<sup>®</sup>) foram imersas em microtubos de 1,5 mL contendo alíquotas do sobrenadante celular para mensurar as variações de pH.

Para a mensuração de lactato, foi utilizado o Lactato Enzimático *Kit* (Labtest), seguindo as especificações do fabricante. Para tal, utilizando-se uma proporção de 4:1 dos Reagentes 1 e 2 do respectivo *kit*, foi adicionado 1 mL da mistura de reagentes a 0,01 mL do sobrenadante de cada grupo celular, aliqüotados previamente em microtubos de 1,5 mL. Após homogeneização, os microtubos foram

incubados a 37°C por 5 minutos, seguido da análise de absorvância em 550 nm no espectrofotômetro *BioMate*™ 3 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

### 3.3.2. Tempo de Duplicação Celular

Após os diferentes grupos celulares serem semeados ( $1,5 \times 10^5$  células) e incubados até a confluência de 90%, com a constante troca do meio de cultura em intervalos regulares de 24 horas, as células foram retiradas da garrafa de cultura utilizando-se tripsina-PBS/ EDTA (1X PBS/ EDTA: 137 mM NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,68 mM EDTA, pH 7,4) e contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer. No momento da contagem de células, a viabilidade celular foi determinada com *Trypan Blue* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Em seguida, o tempo de duplicação celular foi calculado com base na fórmula  $DT = t \cdot \ln(2) / \ln(A/A_0)$ , aonde: DT = tempo de duplicação, A = número de células no intervalo t,  $A_0$  = número de células iniciais (LEGRIER et al., 2007).

### 3.3.3. Avaliação da Migração Celular: Ensaio de Cicatrização da Ferida

Para o ensaio de cicatrização da ferida, foram semeadas  $1,5 \times 10^5$  células, de cada um dos grupos investigados, em microplacas de 6 poços seguido de incubação até a confluência de 90%. A troca do meio de cultura celular e a adição do peptídeo vasoativo (grupo tratamento) na concentração de  $10^{-7}$  M foram realizadas em intervalos regulares de 24 horas como descrito no item 3.1.

Ao atingir a confluência de 90%, foram feitos riscos longitudinais, com auxílio de uma ponteira de 200  $\mu\text{L}$ , na monocamada de células aderente ao fundo dos poços, simulando uma lesão. Com o auxílio de uma câmera digital *COOLPIX S5200*® (Nikon) acoplada à objetiva do microscópio, cada poço foi fotografado no momento da lesão (T = 0 hora) e 24 horas depois. As placas foram analisadas no microscópio binocular invertido *Motic AE2000*® (Motic).

Para a análise das imagens, foi utilizado o *software ImageJ 1.48v* (NIH – <http://imagej.nih.gov/ij>). Para cada tempo e cada grupo estudado, foi mensurada a área com ausência de células.

### 3.3.4. Avaliação da Invasão Celular: Ensaio da Gota de Agarose

Para os ensaios de invasão celular, adaptou-se a técnica descrita por Wiggins e Rappoport (2010), denominada *Agarose Spot Assay* ou Ensaio da Gota de Agarose.

Em ambiente estéril, foi preparada uma solução de agarose 0,8% em PBS 1X, a qual foi aquecida a 100° C e agitada até completa dissolução da agarose. Feito isso, a solução foi resfriada até a temperatura de 40° C e aliqüotada em 2 microtubos de 1,5 mL. As alíquotas foram diluídas na proporção 1:1, com PBS 1X e Meio DMEM/F12 10% SFB para a formação das soluções do controle negativo, e do controle positivo, respectivamente. Um total de quatro gotas de 10 µL das soluções de controle negativo e positivo (duas gotas de cada solução) foram pipetadas nos poços de placas de 6 poços.

Após a polimerização das gotas de agarose a 4° C por 10 min,  $2 \times 10^5$  células dos diferentes grupos de A549 (crescidas na ausência ou presença do heptapeptídeo, e dos clones A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p – abaixo apresentados), foram semeadas nas placas de 6 poços e então, foi adicionado 1 mL de meio de cultura específico para cada grupo celular, conforme descrito nos itens 3.1 e 3.7.

As imagens foram adquiridas nos intervalos de 24, 48 e 72 horas com o auxílio de uma câmera digital *COOLPIX S5200*<sup>®</sup> (Nikon) acoplada à objetiva do microscópio binocular invertido *Motic AE2000*<sup>®</sup> (Motic). Conforme especificado por Wiggins e Rappoport (2010), a região da gota de agarose apresentando a maior quantidade de células invasoras foi utilizada para análise quantitativa.

### 3.3.5. Zimografia

Para esse ensaio, os extratos celulares dos diferentes grupos de células A549 (crescidas na presença ou ausência do heptapeptídeo, e dos clones) foram coletados e homogeneizados em 100 µL de tampão RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1,0% NP-40/ Igepal, 0,1% Dodecil Sulfato de Sódio), seguido de 30 minutos a 4° C. As amostras foram então centrifugadas a 16000 g por 20 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. As

proteínas foram quantificadas utilizando diluições de albumina sérica bovina (BSA) a 1 µg/µL para construção da curva padrão.

Após a quantificação, foi adicionado o tampão de corrida (4% w/v) às amostras. Um total de 100 µg de cada amostra foi carregado aos poços do gel de poliacrilamida a 8%, enriquecida com 0,1% de Gelatina (Sigma - Aldrich®). Após a realização da eletroforese, o gel foi lavado duas vezes, 15 minutos cada, em solução 2,5% *Triton X-100* à temperatura ambiente para a retirada do Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e renaturação das proteínas. O gel foi então lavado duas vezes, 1 minuto cada, em tampão de incubação (0,05 M Tris-HCl pH 8,0, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 µM ZnCl<sub>2</sub>) à temperatura ambiente, e finalmente incubado a 37° C por 15 horas, em aproximadamente 100 mL do tampão de incubação. Terminado o tempo de incubação, o gel foi corado em 0,5% *Comassie Brilliant Blue R-250* por 3 horas, à temperatura ambiente. Para fotodocumentação, o gel foi descorado em solução descorante (45% Metanol, 10% AcOH glacial, 45% Água), até que fossem perceptíveis os halos decorrentes da degradação da gelatina pelas MMPs, e as imagens foram adquiridas com o auxílio de uma câmera digital *COOLPIX S5200*® (Nikon) e de um negatoscópio. A quantificação dos halos foi realizada utilizando-se o programa *ImageJ 1.48v* (NIH – <http://imagej.nih.gov/ij>).

### **3.4. Extração de RNA total e miRNA, e transcrição reversa**

#### **3.4.1. Extração de RNA total**

Após o crescimento das células A549 na presença ou ausência da Ang-(1-7), e dos clones, as mesmas foram coletadas utilizando-se tripsina-PBS/ EDTA (1X PBS/ EDTA: 137 mM NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,68 mM EDTA, pH 7,4) e utilizadas na extração de RNA total com *TRIZOL*® *Reagent* (Thermo Fisher Scientific Inc.), seguindo as recomendações do fornecedor.

Para isso, as células foram ressuspendidas em *TRIZOL*® e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Para cada 1 mL de *TRIZOL*®, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Merck) seguido de agitação vigorosa do microtubo por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C, resultando em uma mistura trifásica, da qual o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo

microtubo de 1,5 mL. Ao sobrenadante adicionou-se 0,5 mL de álcool isopropílico (100%) para cada 1 mL de *TRIZOL*<sup>®</sup>, seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e então, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% para cada 1 mL de *TRIZOL*<sup>®</sup> utilizado. Os microtubos foram cuidadosamente invertidos 5 vezes seguido de centrifugação a 8000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e, para que o precipitado pudesse ficar seco, os microtubos foram colocados em um fluxo laminar por 5 minutos. Esse precipitado de RNA foi ressuscitado em 32 µL de água livre de RNase e quantificado.

As amostras de RNA foram analisadas com o auxílio do aparelho espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare), utilizando-se a razão A260/A280 e A260/A230 para se avaliar a qualidade do RNA extraído.

#### 3.4.2. Extração de miRNA

Para a análise da expressão de miRNAs, os mesmos foram extraídos das células A549 crescidas na presença ou ausência do heptapeptídeo, e dos clones, utilizando o *miRNase mini kit* (Qiagen<sup>®</sup>), seguindo as recomendações do fabricante. Para tanto, as células foram ressuscitadas em 700 µL de *QIAzol Lysis Reagent* e incubadas a temperatura ambiente durante 5 min. Logo após foram adicionados 140 µL de clorofórmio a cada amostra e a mistura foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 3 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 15 min, a 4°C. Os sobrenadantes foram então transferidos para novos microtubos de 1,5 mL e a eles foram adicionados 1,5 x v/v de etanol. As amostras foram então transferidas para as mini colunas (*RNeasy<sup>®</sup> Mini Column* - Qiagen<sup>®</sup>) e em sequência foram centrifugadas a 8.000 rpm, por 15 segundos à temperatura ambiente. Descartaram-se os filtrados. Em seguida, foram adicionados 700 µL de tampão RWT (Qiagen<sup>®</sup>) em cada uma das colunas, com posterior centrifugação a 8.000 rpm, por 15 segundos à temperatura ambiente. Os filtrados foram descartados e foram adicionados 500 µL de tampão RPE (Qiagen<sup>®</sup>) às colunas, seguido de nova centrifugação a 8.000 rpm por 15 segundos à temperatura ambiente. Novamente, os filtrados foram descartados e outros 500 µL de tampão RPE foram adicionados às colunas, com posterior centrifugação a 8.000 rpm por 2

minutos à temperatura ambiente. Após o descarte dos filtrados, as colunas foram colocadas em novos microtubos de 1,5 mL, com posterior centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente. As colunas foram então transferidas para microtubos de 1,5 ml e foram adicionados 50 µL de água livre de RNase diretamente sobre as membranas das colunas, com posterior centrifugação à temperatura ambiente por 1 min a 8.000 rpm. Os filtrados foram quantificados no espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare) a 260nm, utilizando a razão A260/A280 e A260/A230.

#### 3.4.3. Transcrição reversa: RNA

Para síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total extraído dos grupos celulares, utilizou-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.). As reações de transcrição reversa foram realizadas com 1 µg do RNA extraído, 10 µM de oligonucleotídeos (10 x RT *Random primer*), 8 mM de dNTPs [25 x dNTP *Mix*] e 1,25 U de transcriptase reversa (*Multi Script™ Reverse Transcriptase*) conforme especificado pelo fabricante. Com o auxílio do termociclador *Mastercycler pro S®* (Eppendorf), as reações foram incubadas a 25°C por um intervalo de 10 minutos, seguido de incubação a 37°C por 120 minutos e inativação enzimática a 85°C por 5 minutos, conforme as orientações do fornecedor. O excedente da amostra de RNA total extraído foi armazenado a -80°C, enquanto que o cDNA sintetizado foi diluído (1:10) e estocado a -20°C até sua utilização.

#### 3.4.4. Transcrição reversa: miRNA

A síntese de cDNA a partir das amostras de RNAs totais extraídos, enriquecidas com miRNAs, foi realizada por reações de transcrição reversa utilizando o *MiScript II RT Kit* (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Para essas reações, 2 µg de RNA total enriquecidos com miRNAs foram utilizadas além de 20 mM de tampão (5 x *miScript HiSpec Buffer*), 10 mM de oligonucleotídeos (10 x *miScript Nucleics Mix*), 10 mM da enzima transcriptase reversa (*miScript Reverse Transcriptase Mix*), água livre de RNases em quantidade suficiente para um volume final de 20 µL. Com o auxílio do termociclador *Mastercycler pro S®* (Eppendorf), a mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguido de 120 minutos

a 37°C e 85°C por 5 minutos para inativação da transcriptase reversa, seguindo as informações do fornecedor dos reagentes.

### 3.5. Análise de expressão gênica por reações de PCR convencional e PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

#### 3.5.1. Reações de PCR convencional

Para as reações de PCR convencional, as sequências codificadoras de genes correlatos ao processo apoptótico foram obtidas do *National Center for Biotechnology Information*, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e utilizadas para desenho dos oligonucleotídeos (Tabela 1) com o auxílio de ferramentas básicas de bioinformáticas como software Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)).

**Tabela 1** - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR convencional e suas respectivas temperaturas de anelamento (T<sub>m</sub>).

Gene	Sequência	T <sub>m</sub>
<i>β-actina</i>	AS: 5' - GATCATGTTTGAGACCTTCAACAC S: 5' - GATCATGTTTGAGACCTTCAACAC	54°C
<i>bax</i>	AS: 5' - CGTCACACTTCATGATGGAGTTGA S: 5' - TGGCAGCTGACATGTTTTCTGAC	56°C
<i>bcl2</i>	AS: 5' - GTCCAACCACCCTGGTCTTGG S: 5' - TTTGAGTTCGGTGGGGTCAT	54°C
<i>caspase 3</i>	AS: 5' - TGACTTCACTTGTGGCCCAG S: 5' - GCACACATTATAGCTACTGG	54°C
<i>caspase 9</i>	AS: 5' - GTTAAACTCCGACGACGTATTA S: 5' - CGTGGTGGTCATTCTCTCTCA	59°C
<i>fas</i>	AS: 5' - CTTGACACTGCGTCCAGCTG S: 5' - ACCTCTGGTTCTTACGTCTGTTGC	56°C

Após a síntese de cDNA, reações de PCR foram processadas em um volume final de 15 µl, utilizando 2 µl do cDNA (1:10), 10 µM de oligonucleotídeos direto e reverso, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, solução tampão para PCR (1 X), 250 µM de dNTP e 1,25 U da enzima *Taq DNA polimerase* (Thermo Fisher Scientific Inc.). As reações foram processadas em triplicatas.

As reações foram realizadas com o auxílio do termociclador *Mastercycler pro S*<sup>®</sup> (Eppendorf) e então submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0%. Para a quantificação dos resultados foi utilizado o software *ImageJ 1.48v* (NIH –

<http://imagej.nih.gov/ij>), levando em consideração a intensidade de sinal por unidade de área.

### 3.5.2. Reações de qPCR: mRNAs

Para as reações de qPCR, as sequências codificadoras dos genes de interesse foram obtidas do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e utilizadas para desenho dos oligonucleotídeos (Tabela 2) com o auxílio de ferramentas básicas de bioinformáticas como software Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)).

**Tabela 2** - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR.

Gene	Sequência
<i>β-actina</i>	S: 5' - CGGGACCTGACTGACTAC AS: 5' - CTCCTTAATGTCACGCAC
<i>cldn1</i>	S: 5' - CTCCTGACAATGTATCC AS: 5' - ATGAAGAGAGCAGAAGCC
<i>epcam</i>	S: 5' - GGTTGTGGTGATAGCAGTTG AS: 5' - GCCTTCTCATACTTTGCC
<i>itgb8</i>	S: 5' - AGATTGCTGCTGGTGATG AS: 5' - ACAGTTTCCGTCATTGGG
<i>tjp1</i>	S: 5' - GAACGAGGCATCATCCCTAA AS: 5' - GCTGCGAAGACCTCTGAATC
<i>ocln</i>	S: 5' - AAAGAACTCTCCCGTTTGG AS: 5' - GCAGATCCCTTCACTTGCTT
<i>ctnnb1</i>	S: 5' - CCATTCCATTGTTTGTGTCAG AS: 5' - CTTCTGCAGCTTCCCTTGTCC
<i>cdh5</i>	S: 5' - AGGCCAGGTATGAGATCGTG AS: 5' - TCTTGCAGAGTGACCAGCAC
<i>mmp1</i>	S: 5' - CTGAAGGTGATGAAGCAGCC AS: 5' - AGTCCAAGAGAATGGCCGAG
<i>mmp2</i>	S: 5' - GACCCAGAGACAGTGGATGA AS: 5' - CAGTGCAGCTGTTGTACTCC
<i>mmp8</i>	S: 5' - TGATGCTATCACCACACTCC AS: 5' - GTAGAAAACAGCTGCGTCAA
<i>mmp9</i>	S: 5' - CCAGTTTCCATTCATCTTCC AS: 5' - TCTTGTGCTGTCAAAGTTC
<i>mmp13</i>	S: 5' - GTGACTGGCAAACCTTGACGA AS: 5' - GGTAGAAGTCGCCATGCTCC
<i>mmp15</i>	S: 5' - GGCCGACATCATGGTACTCT AS: 5' - GTCAACGTCCTTCCACTGGT
<i>timp1</i>	S: 5' - GTTGTGCTGTGGCTGATAG AS: 5' - GTGATGTGCAAGAGTCCATC
<i>timp2</i>	S: 5' - TCAGTGAGAAGGAGGTGGAC AS: 5' - ATCTGGTACCTGTGGTTCCAG

<i>timp3</i>	<b>S:</b> 5' - GTGCAACTTCGTGGAGAGGT <b>AS:</b> 5' - TCTGTGGCATTGATGATGCT
<i>akt1</i>	<b>S:</b> 5' - CGGGCACATTAAGATCACAG <b>AS:</b> 5' - TCATTGTCCTCCAGCACCTC
<i>gsk3<math>\beta</math></i>	<b>S:</b> 5' - AATGGGCGAGACACACCTGC <b>AS:</b> 5' - GCTTGAATCCGAGCATGAGG
<i>Pten</i>	<b>S:</b> 5' - CCGGCAGCATCAAATGTTTC <b>AS:</b> 5' - GGCAACCACAGCCATCGTTA

As reações de qPCR foram realizadas utilizando-se *SYBR Green/ Rox qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Inc.) e placas de 96 poços vedadas com o selo óptico (*MicroAmp<sup>®</sup> Optical Adhesive Film* - Thermo Fisher Scientific Inc.). Cada reação foi processada em um volume final de 10  $\mu$ L, em cada qual contendo 0,75  $\mu$ M de oligonucleotídeos, 2  $\mu$ L de cDNA (1:10) e 5  $\mu$ L de *SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix*. As reações foram processadas em triplicatas.

As reações foram realizadas no ciclador *7500 Real-Time PCR* (Thermo Fisher Scientific Inc.) em triplicatas. O método de quantificação relativa da expressão gênica ( $\Delta$ CT) foi utilizado, permitindo quantificar diferenças nos níveis de expressão de um alvo específico entre diferentes amostras.

### 3.5.3. Reações de qPCR: microRNAs

Os oligonucleotídeos (Tabela 3) utilizados para análise de expressão dos miRNAs de interesse foram desenhados com o auxílio de ferramentas básicas de bioinformáticas, como software Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)), a partir de suas respectivas sequências maduras disponíveis nos bancos de dados mirDB (<http://mirdb.org/miRDB/>), MiRBase (<http://www.mirbase.org/>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**Tabela 3** - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR de miRNAs envolvidos no processo tumoral pulmonar.

miRNA	Sequência
hsa-miR-1-3p	<b>S:</b> 5' – TGGAAATGTAAAGAAGTATGTAT
hsa-miR-21-5p	<b>S:</b> 5' – TAGCTTATCAGACTGATGTTGA
hsa-miR-U6	<b>S:</b> 5' – TGGCCCCTGCGCAAGGATG

As reações de qPCR foram realizadas com o *miScript SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit* (Qiagen<sup>®</sup>). O cálculo da expressão gênica relativa dos miRNAs foi realizado pelo método do  $\Delta$ Ct, conforme sugerido pelo fabricante do aparelho *7500 Real-Time PCR* (Thermo Fisher Scientific Inc.).

### 3.6. Clonagem do hsa-miR-21-5p

#### 3.6.1. Extração do DNA genômico (gDNA) de células A549

O gDNA foi extraído de células A549 não tratadas com Ang-(1-7). Para isso, as células foram incubadas com tampão de lise contendo 0,15 M NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS e 50 mM Tris-HCl pH 7,6, adaptando-se metodologia descrita em Sambrook et al. (1989). Em seguida, o material genético foi precipitado e purificado através da extração com fenol-clorofórmio. A verificação da qualidade e concentração do DNA preparado foi avaliada em espectrofotômetro *NanoVue<sup>™</sup> Plus* (GE Healthcare) utilizando a razão A260/A280 e A260/A230 ~ 2.0.

#### 3.6.2. Amplificação da sequência precursora do hsa-miR-21-5p por PCR

Aproximadamente 50 ng de gDNA foram utilizadas na reação de PCR convencional para amplificar a região do genoma aonde se insere a sequência precursora do miRNA hsa-miR-21-5p. Inicialmente, a sequência precursora miR-21 foi adquirida dos bancos de dados, miRBase (<http://www.mirbase.org/>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), e analisada no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Conforme as orientações do fornecedor do plasmídeo *miRNASelect<sup>™</sup> pEP-miR Cloning and Expression Vector* (Cell Biolabs Inc.), considerou-se a sequência precursora do microRNA, acrescida de 100 bases nos flancos (à montante e a jusante), para o desenho dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR convencional.

Aos oligonucleotídeos direto (sense: 5' – TCGAGGATCCGTTTTTTTGGTTTGT – 3') e reverso (anti-sense: 5' – TCGAGCTAGCAGACAGAAGGACCAGAGTTTC – 3') foram inseridas bases correspondentes aos sítios das enzimas *Bam* HI e *Nhe* I, respectivamente.

### 3.6.3. Digestão com enzimas de restrição

Após a amplificação dos fragmentos por PCR, estes foram devidamente digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Nhe* I (NEW ENGLAND BioLabs®), conforme as especificações do fabricante. Paralelamente o vetor *miRNASelect™ pEP-miR Cloning and Expression Vector* (Cell Biolabs Inc.) também foi digerido com as enzimas *Bam* HI e *Nhe* I.

### 3.6.4. Reação de ligação

Utilizando-se orientações gerais de clonagem (SAMBROOK et al., 1989), inserto e vetor foram ligados em reações de ligação utilizando-se aproximadamente 2 µg do vetor digerido, 6 µg do inserto digerido, 10% v/v de tampão (*10 X T4 DNA Ligase Buffer* – NEW ENGLAND BioLabs®), 10% v/v de ATP e 10% v/v de enzima (*T4 DNA Ligase* – NEW ENGLAND BioLabs®), incubados a 16°C por um intervalo de 16 h.

### 3.6.5. Transformação bacteriana e sequenciamento

O plasmídeo recombinante foi utilizado na transformação de bactérias DH5α (F-, Φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (rk-, mk+), phoA, supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1) adaptando-se metodologia descrita em Sambrook et al. (1989).

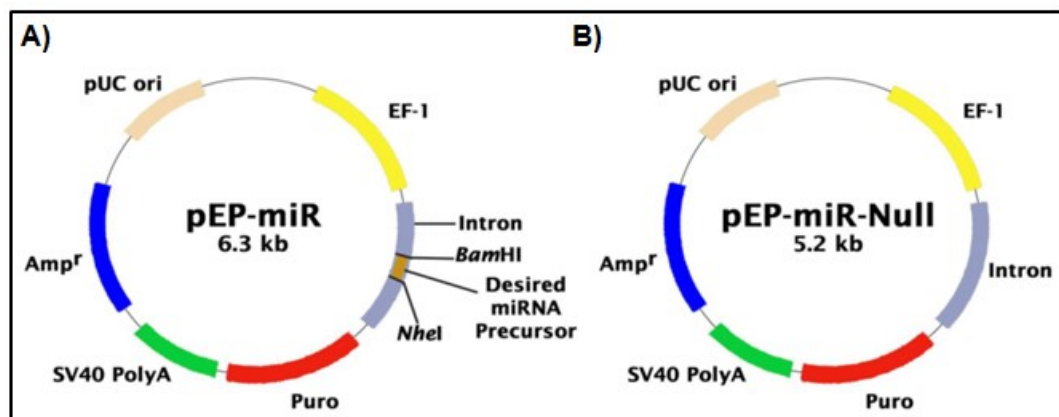
Após a transformação, colônias de bactérias foram analisadas por PCR de colônia, processadas em um volume final de 15 µl contendo 10 µM de oligonucleotídeos sense (5' – TCGAGGATCCGTTTTTTGGTTTGT TTTTGT – 3') e anti-sense (5' – TCGAGCTAGCAGACAGAAGGACCAGAGTTTC – 3') do hsa-miR-21, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, solução tampão para PCR (1X), 250 µM de dNTP, 1,25 U da enzima *Taq DNA polimerase* (Thermo Fisher Scientific Inc.) e uma colônia bacteriana removida da placa de Petri com o auxílio de uma ponteira de 2 µl. A clonagem foi confirmada por digestão enzimática [*Bam* HI e *Nhe* I (NEW ENGLAND BioLabs®)] dos clones de interesse, e subsequente eletroforese em gel de agarose 1%.

Os plasmídeos recombinantes de algumas colônias de interesse foram preparados seguindo protocolo padrão descrito em Sambrook et al. (1989), isolados e sequenciados no Centro de Genômica da ESALQ – Piracicaba/ SP, utilizando-se sequenciamento que se embasa nas reações de Sanger. Considerando-se as especificidades dos clones, oligonucleotídeos apropriados foram utilizados nas reações de sequenciamento (pEPmiR-Seq sense: 5' – TCCTCAGCCGTCGCTTCATG – 3' e pEPmiR-Seq anti-Sense: 5' – GTGTGGGGAAACTCCATCGC – 3'). Os resultados de sequenciamento foram analisados com o software *BioEdit* v7.2.5 (Tom Hall – Ibis Biosciences) para verificar e comprovar a eficácia das clonagens.

### 3.7. Estabelecimento dos clones celulares

Para o estabelecimento dos clones A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p, células A549 foram respectivamente transfectadas com o vetor controle *miRNASelect™ pEP-miR Null Control Vector* (Cell Biolabs Inc.) e o vetor de clonagem *miRNASelect™ pEP-miR Cloning and Expression Vector* (Cell Biolabs Inc.), preparado conforme relatado no item 3.5, utilizando-se *Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent* (Thermo Fisher Scientific Inc.), conforme especificação do fabricante. Os vetores utilizados nas transfecções celulares estão representados esquematicamente na Figura 4.

**Figura 5** - Representação esquemática dos vetores de clonagem. A) Vetor de clonagem *miRNASelect™ pEP-miR Cloning and Expression Vector* (Cell Biolabs Inc.) utilizado para estabelecimento do clone A549-pEP-miR-21-5p. B) Vetor controle *miRNASelect™ pEP-miR Null Control Vector* (Cell Biolabs Inc.) utilizado para estabelecimento do clone A549-pEP-miR-Controle.



Fonte: Cell Biolabs Inc.

O vetor *miRNASelect™ pEP-miR Cloning and Expression Vector* (Cell Biolabs Inc. - Figura 4A) foi projetado para a clonagem e expressão de precursores de miRNAs individuais, preservando estruturas putativas do grampo de miRNA e garantindo a interação do mesmo com a maquinaria de processamento endógeno da célula e com moléculas regulatórias, levando à correta clivagem dos miRNAs. Os precursores individuais de miRNA, flanqueados por suas sequências intrônicas, podem ser clonados entre os sítios de *Bam* HI e *Nhe* I. Além disso, o vetor apresenta a região promotora EF-1 $\alpha$  (garantindo alta taxa de expressão em células de mamíferos), marcador de resistência à Puromicina (seleção estável de células transfectadas), o sinal SV40 PoliA (garante, com eficiência, a terminação da transcrição), origem de replicação pUC (promovendo alta taxa de replicação e manutenção do plasmídeo em *E. coli*) e o gene de resistência à Ampicilina (para seleção de *E. coli*). O controle *miRNASelect™ pEP-miR Null Control Vector* (Cell Biolabs Inc. - Figura 4B) é bem similar ao vetor de clonagem e expressão, exceto pela ausência do precursor de miRNA e dos sítios de clonagem *Bam* HI e *Nhe* I.

Para a realização da transfecção,  $2 \times 10^4$  células A549 foram cultivadas em placas de 24 poços. Os plasmídeos foram separadamente diluídos à concentração de 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , em microtubos de 1,5 mL contendo 50  $\mu\text{L}$  meio *Opti-MEM*, e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em um novo microtubo de 1,5 mL, foram diluídos 2  $\mu\text{L}$  de *Lipofectamine® 2000* em 50  $\mu\text{L}$  de meio *Opti-MEM*, seguido de incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente foi realizada a mistura do conteúdo dos dois microtubos, seguida de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos para que o complexo de transfecção seja formado. Após esse período, acrescentou-se 400  $\mu\text{L}$  de meio DMEM/F12 à mistura, a qual foi adicionada na placa de 24 poços com as células, seguida de incubação à 37°C. Após 6 horas de transfecção, trocou-se o meio da placa por DMEM/F12 e, novamente, a placa foi incubada à 37°C por 24 horas. O meio DMEM/F12 foi então substituído por DMEM/F12 contendo puromicina na concentração de 0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

O estabelecimento dos clones permanentes, A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p, deu-se pela manutenção das culturas transfectadas por considerável intervalo de tempo em meio de cultura DMEM/F12, contendo o antibiótico Puromicina. Após a seleção dos clones por reações de qPCR, os

mesmos foram utilizados nas análises funcionais. As novas linhagens estabelecidas foram armazenadas em nitrogênio líquido.

### **3.8. Análise de bioinformática**

A análise dos miRNAs de interesse para o presente estudo foi realizada por bioinformática utilizando-se informações disponíveis em banco de dados como mirDB (<http://mirdb.org/miRDB/>), MiRBase (<http://www.mirbase.org/>) e Target Scan (<http://www.targetscan.org/>). As sequências maduras dos miRNAs e os oligonucleotídeos dos genes de interesse foram analisados e desenhadas em ferramentas básicas de bioinformáticas como o Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)) e o Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), respectivamente.

### **3.9. Análise estatística**

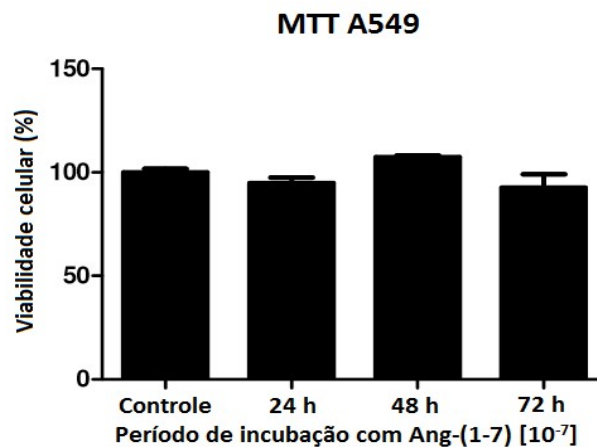
Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados com o auxílio do programa *Graph Pad Prism® 3.0 software*, através do teste *One Way ANOVA* seguido de análise de *Dunnett*, e do teste *Two-Way ANOVA*. O nível de significância adotado foi de  $*p \leq 0,05$  com intervalo de confiança de 95%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Resultados de viabilidade celular

Inicialmente, foram realizados ensaios de viabilidade celular para se avaliar o potencial citotóxico do peptídeo Ang-(1-7) em culturas celulares de A549. Como mencionado anteriormente, adotou-se a concentração de Ang-(1-7) a  $10^{-7}$  M com base em estudos científicos prévios (SAMPAIO et al., 2007; VERANO-BRAGA et al., 2012), e os resultados obtidos corroboram com a literatura disponível, uma vez que não foi observada nenhuma alteração significativa na viabilidade das células A549, decorrentes do tratamento por um período de incubação de até 72 horas (Figura 6).

**Figura 6** - Ensaio de Viabilidade de Células A549 crescidas na ausência (Controle) e presença de  $10^{-7}$  M do heptapeptídeo Ang-(1-7). O tempo de incubação utilizado no ensaio foi 0, 24, 48 e 72 horas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. \* $p \leq 0.05$ .



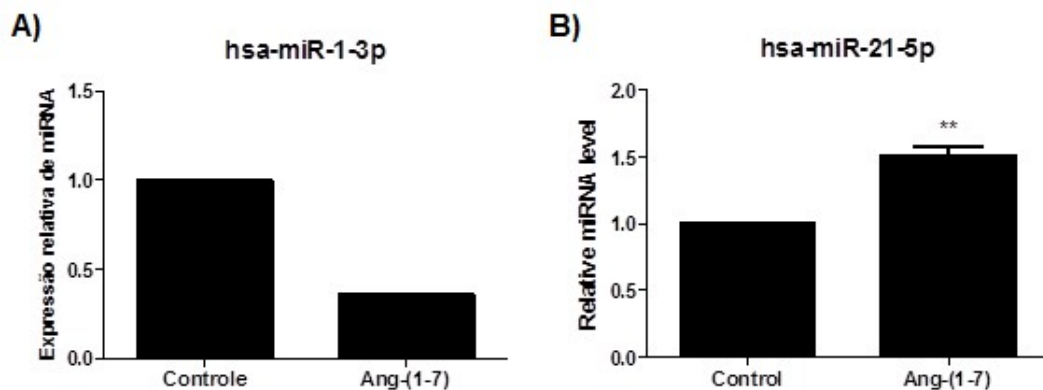
### 4.2. Análises de bioinformática e qPCR de miRNAs

Com base na literatura científica e análises em banco de dados de miRNAs, os microRNAs hsa-miR-1-3p e hsa-miR-21-5p foram selecionados como alvos de estudo no presente trabalho.

O vetor de clonagem *miRNASelect™ pEP-miR Cloning and Expression Vector* (Cell Biolabs Inc.) possui uma região específica para inserção da sequência precursora do miRNA de interesse, podendo assim expressar, mediante transfecção, ambos miRNAs maduros nas células. Entretanto, evidências

experimentais apontam, para ambos microRNAs selecionados, apenas um miRNA maduro (miR-1-3p e miR-21-5p), sugerindo instabilidade e, conseqüentemente, a degradação, da molécula complementar (miR-1-5p e miR-21-3p). Além disso, optou-se por selecionar microRNAs de relevância no processo tumoral pulmonar que apresentassem níveis de expressão distintos entre si. Neste contexto, o miR-21-5p é classicamente descrito como um miRNA super-expresso e de extrema importância para o desenvolvimento tumoral (SELCUKLU et al., 2009; KRICHEVSKY; GABRIELY, 2009; LI, Y. et al., 2010; MOORE; ZHANG, 2010; ROSSI et al., 2010; SHI, L. et al., 2010; LI, S. et al., 2012), enquanto que o miR-1-3p é frequentemente regulado negativamente no câncer pulmonar (NASSER et al., 2008; MELKAMU et al., 2010; TOMINAGA et al., 2013; YU, Q. et al., 2014; ZHAO et al., 2014) sugerindo um potencial anti-tumorigênico. Após essas análises iniciais, foram realizadas reações de qPCR (Figura 7) para analisar o padrão de expressão do miR-21-5p e miR-1-3p em células A549, na ausência e presença do peptídeo Ang-(1-7).

**Figura 7** - Nível de expressão relativa dos miRNAs hsa-miR-1-3p e hsa-miR-21-5p em células A549 crescidas até a confluência na ausência (Controle) e presença da Ang-(1-7). A expressão gênica relativa apresentada nos gráficos foi normalizada em relação ao gene *U6*. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .



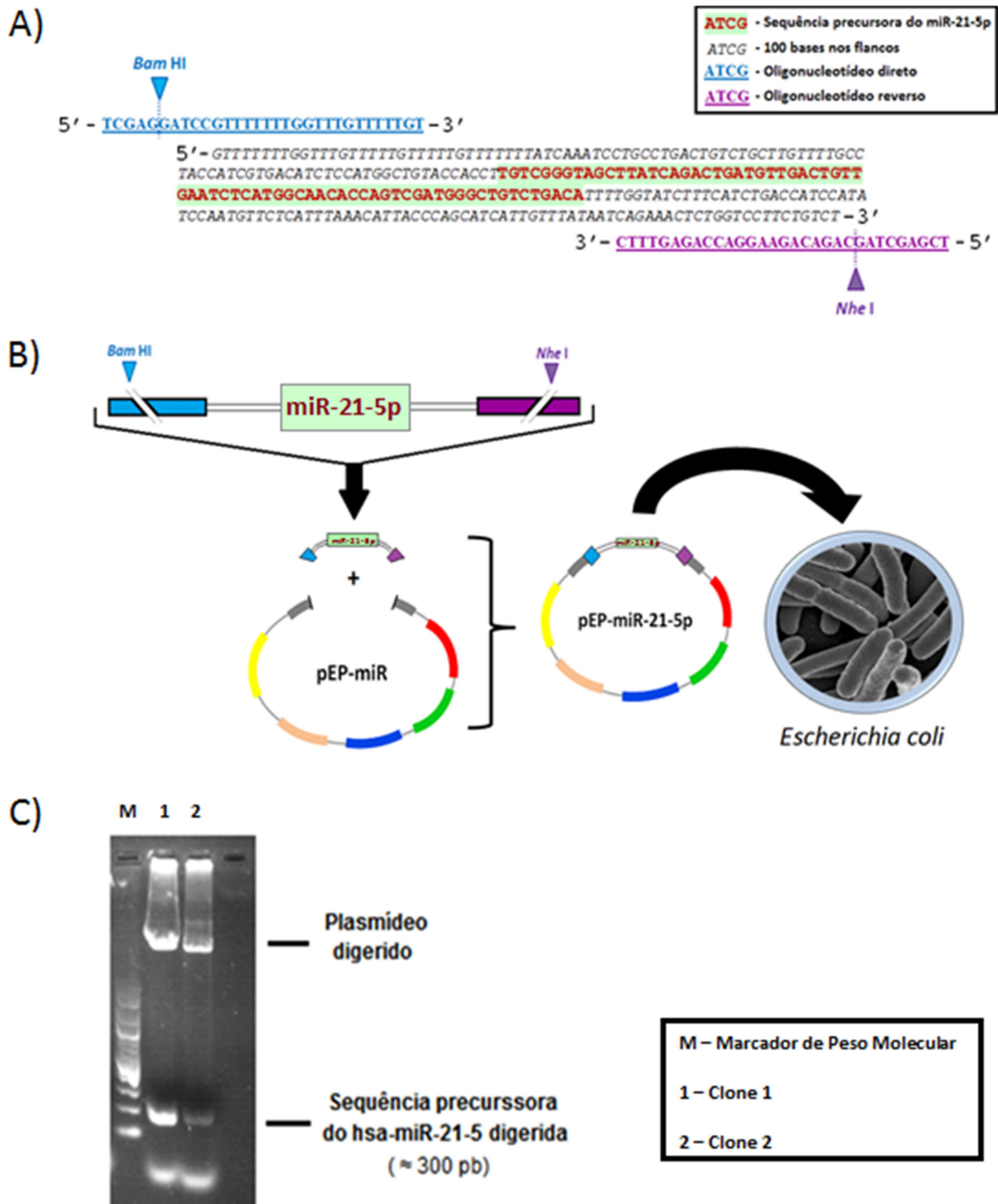
Os dados apresentados mostram que o tratamento celular com Ang-(1-7) não alterou significativamente a expressão do miR-1-3p em relação ao grupo controle (Figura 7A). Entretanto, a presença do heptapeptídeo elevou significativamente os níveis transcricionais do miR-21-5p quando comparado ao grupo A549 controle (Figura 7B), sugerindo que o heptapeptídeo module positivamente o processo tumoral, via regulação positiva do miR-21-5p.

### **4.3. Clonagem e transfecção celular: o estabelecimento dos clones celulares A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p**

Considerando-se o aumento da expressão do miR-21-5p mediante o tratamento com a Ang-(1-7), ensaios de clonagem e transfecção, para obtenção dos clones celulares A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p foram realizados. A obtenção dos clones que superexpressam o miRNA-21-5p viabilizou a análise pontual do efeito desta molécula nas células A549 e possibilitou uma análise comparativa dos efeitos celulares e moleculares do microRNA com os efeitos sistêmicos do tratamento com o heptapeptídeo.

Inicialmente, a sequência precursora do miR-21 foi clonada no vetor de expressão pEP-miR como apresentada na Figura 8.

**Figura 8** - Clonagem do miR-21-5p. (A) Sequência precursora do miR-21, acrescida de 100 bases em ambas as extremidades, utilizada para desenho dos oligonucleotídeos; (B) Digestão do amplicon, produzido na reação de PCR convencional, com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Nhe* I, seguido da inserção e ligação no vetor pEP-miR, e transformação de *E.coli*; (C) Eletroforese em gel de agarose 1.0% contendo a digestão, nos sítios de restrição *Bam* HI e *Nhe* I, de dois produtos de PCR de colônia.

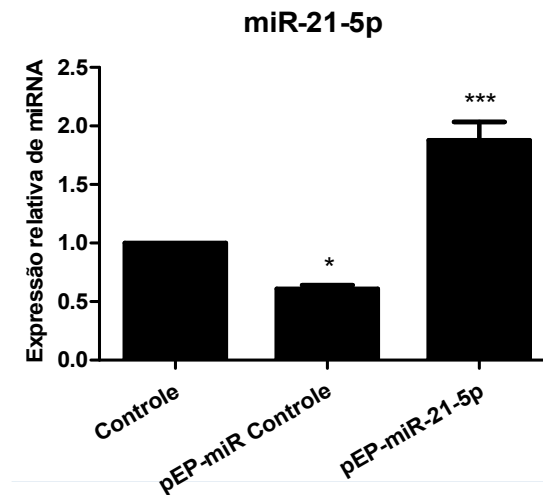


Fonte: Lima (2016); NCBI (2016).

Após as transformações bacterianas e a seleção dos clones de interesse, células A549 foram transfectadas, conforme protocolo previamente descrito, e os clones celulares (A549-pEP-miR-21-5p e A549-pEP-miR-Controle) foram

estabelecidos. A escolha do clone a ser estudado embasou-se em reações de qPCR (Figura 9).

**Figura 9** - Confirmação da transfecção celular por reação de qPCR. Nível de expressão relativa do miRNA hsa-miR-21-5p nos clones estabelecidos em relação às células A549 controle. A expressão gênica relativa apresentada nos gráficos foi normalizada em relação ao gene *U6*. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .



Pela análise dos resultados de qPCR, fica evidente a superexpressão do miR-21-5p pelo clone A549-pEP-miR-21-5p, revelando a eficiência no estabelecimento do clone. Entretanto, foi observado que o clone A549-pEP-miR-Controle apresenta uma redução na expressão do miRNA-21-5p em relação ao grupo celular A549 controle sendo que a transfecção celular com o controle miRNASelect™ pEP-miR Null Control Vector (Cell Biolabs Inc.) não deveria acarretar nenhuma alteração na homeostase celular. Uma possível explicação para o fato seria a presença da Puromicina no meio de cultura dos clones. Sabe-se que a puromicina apresenta rápido poder de ação e capacidade de induzir morte celular mesmo em baixas concentrações (LEE; WURSTER, 1995), mas, além disso, este antibiótico é conhecido por inibir a síntese de proteínas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010), o que pode resultar em uma redução nos níveis de fatores de transcrição e consequentemente, nos níveis do miR-21-5p, como observado.

Com os clones A549 em mãos, quatro grupos de análises foram estabelecidos e com eles trabalhados ao longo do desenvolvimento do trabalho: células A549 não tratadas (controle) ou tratadas com o Ang-(1-7) e os clones pEP-miR.

#### 4.4. Tempo de duplicação celular e análises bioquímicas

Uma vez atingida a confluência de 90%, as células foram tripsinizadas e contadas para se calcular o tempo de duplicação celular em cada grupo estudado. A Tabela 5 apresenta os valores encontrados.

**Tabela 4** – Tempo de duplicação celular por grupo estudado.

Grupos	Tempo de Duplicação
<i>A549 (Controle)</i>	<i>18 horas e 10 minutos</i>
<i>A549 + Ang-(1-7)</i>	<i>22 horas e 20 minutos</i>
<i>A549-pEP-miR-Controle</i>	<i>17 horas e 35 minutos</i>
<i>A549-pEP-miR-21-5p</i>	<i>18 horas e 10 minutos</i>

Para a realização da contagem celular, foi utilizado *Trypan Blue* (Thermo Fisher Scientific Inc.) para se diferenciar células mortas de células vivas; devido à permeabilidade seletiva da membrana celular, células vivas não permitem a entrada do corante, ao contrário das células mortas que se apresentam de forma azulada quando observadas no microscópio. Do total de células contadas, menos de 0,5% eram células mortas, e esse número era indiferente entre os grupos celulares analisados. A baixa taxa de células mortas evidencia que os tratamentos e condições de cultura celular não afetam a viabilidade das células A549.

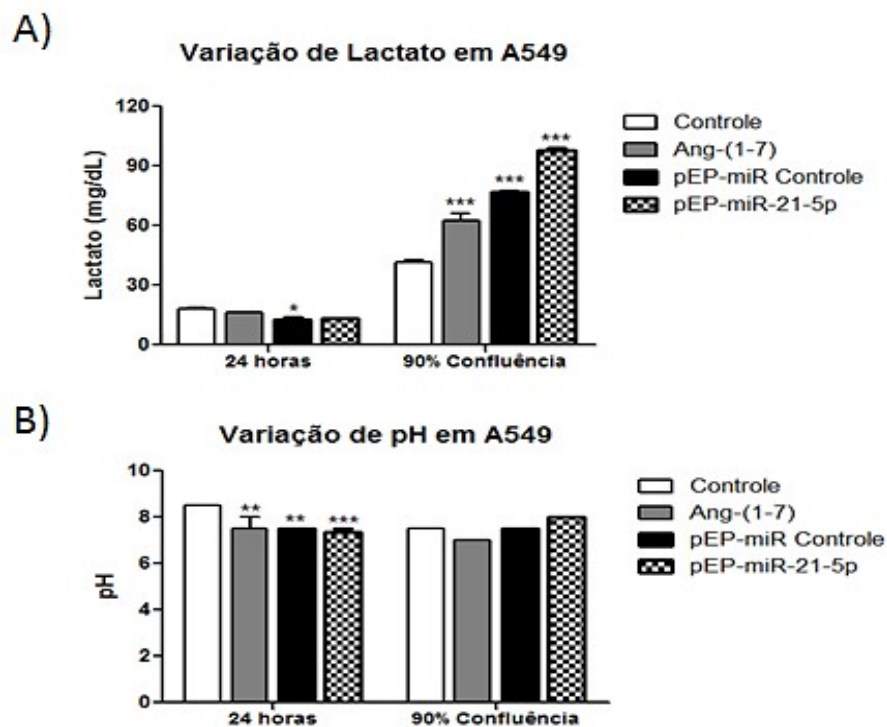
Os resultados do tempo de duplicação celular mostram que a presença da Ang-(1-7) aumenta o intervalo de tempo para duplicação, em aproximadamente 22%, quando comparado ao grupo controle, sugerindo então que a presença do heptapeptídeo possa retardar a proliferação celular ou interferir na regulação do ciclo celular. O clone A549-pEP-miR-Controle apresentou uma leve redução de 3,2% no intervalo entre as duplicações celulares, quando comparado ao grupo controle. Ao ser analisado o tempo de duplicação celular do clone A549-pEP-miR-21-5p, percebe-se que o resultado é igual ao apresentado pelo grupo controle. Este resultado corrobora o estudo de Cheng et al. (2005), o qual observou que não existe, necessariamente, uma relação direta entre a presença do miRNA-21 e a taxa de crescimento celular.

Paralelamente, foram realizadas análises bioquímicas para se avaliar os possíveis efeitos do tratamento com Ang-(1-7) e da superexpressão do miR-21-5p

em relação ao grupo controle. Para tanto, foram mensuradas a produção de lactato e a variação nos níveis de pH do meio de cultura, em cada um dos grupos celulares analisados (Figura 10).

Os resultados mostram que em todos os grupos analisados existe um aumento nos níveis de lactato (Figura 10A) detectados quando as células atingem 90% de confluência em relação às 24 horas iniciais. Após as primeiras 24 horas de incubação, apenas o clone A549-pEP-miR-Controle apresentou uma redução nos níveis de lactato em relação ao grupo controle. Entretanto, após atingirem a confluência, todos os grupos apresentaram aumento nos níveis de lactato em relação ao grupo A549 controle.

**Figura 10** – Ensaio Bioquímico. Sobrenadante das culturas celulares de A549 crescidas na ausência (controle) e presença do heptapeptídeo Ang-(1-7), e dos clones A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p, foram analisados para mensurar (A) a produção de lactato e (B) os valores de pH do meio de cultura celular. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste *One-Way ANOVA* com pós-teste de Dunnett. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  e \*\*\*  $p \leq 0.001$ .



Quando as células atingem 90% de confluência, é observado uma síntese progressiva de lactato nos grupos tratamento, A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p, respectivamente. Sugere-se que o tratamento com Ang-(1-7) e as alterações metabólicas causadas pelas transfecções sejam responsáveis pelo aumento nos níveis de lactato.

Sabe-se que as células cancerígenas apresentam um metabolismo alterado, comparado às células normais, o qual as confere vantagens para sua sobrevivência e proliferação. Com o rápido crescimento tumoral, a capacidade limite de difusão do fornecimento sanguíneo local é excedida, levando à condição de hipóxia. Com isso, o metabolismo celular é conseqüentemente alterado de maneira à menor dependência da via oxidativa (DENKO, 2008). Este mesmo efeito foi observado no estudo de Otto Warburg, onde células cancerígenas preferencialmente utilizavam vias glicolíticas para geração de energia, enquanto que atividade respiratória aeróbica era regulada negativamente (WARBURG, 1956; MATOBA et al., 2006); esta observação foi denominada Efeito Warburg. Assim, o piruvato não é metabolizado pela mitocôndria, mas é convertido em lactato pela lactato desidrogenase (LDH) e então, liberado no espaço extracelular (DENKO, 2008; DRAOUI; FERON, 2011). Interessantemente, o lactato foi descrito como um combustível metabólico alternativo para células cancerígenas (SONVEAUX et al., 2008; FERON, 2009; WHITAKER-MENEZES et al., 2011), de modo que as células tumorais com fácil acesso ao oxigênio poderiam usar o lactato ao invés de glicose de modo a poupá-la e permitir que ela se difunda pelo tumor, servindo de combustível para as células distantes dos vasos sanguíneos, ou em condição de hipóxia (SONVEAUX et al., 2008).

Curiosamente, nas análises realizadas, o peptídeo Ang-(1-7) apontado como um potencial agente antitumoral está, neste caso, estimulando a síntese de lactato, reforçando a atuação do mesmo na alteração do metabolismo celular. Essa alteração também foi encontrada nos grupos pEP-miR-Controle e pEP-miR-21-5p. Para esses dois clones podemos sugerir que as alterações metabólicas correlacionem-se com a presença de puomicina no meio de cultura, (LEE; WURSTER, 1995; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010), que pode regular a expressão de proteínas correlatas ao metabolismo celular, modulando positivamente a via de lactato.

Paralelamente, a análise da variação de pH (Figura 10B) mostrou que após as primeiras 24 horas de incubação, ocorre uma pequena redução do pH nos grupos tratamento, A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p, provavelmente devido à adaptação da cultura celular ao contato com o peptídeo Ang-(1-7) e à puomicina acrescentadas ao meio de cultura do grupo tratamento e dos clones, respectivamente. Por outro lado, não foram observadas alterações no pH, entre os

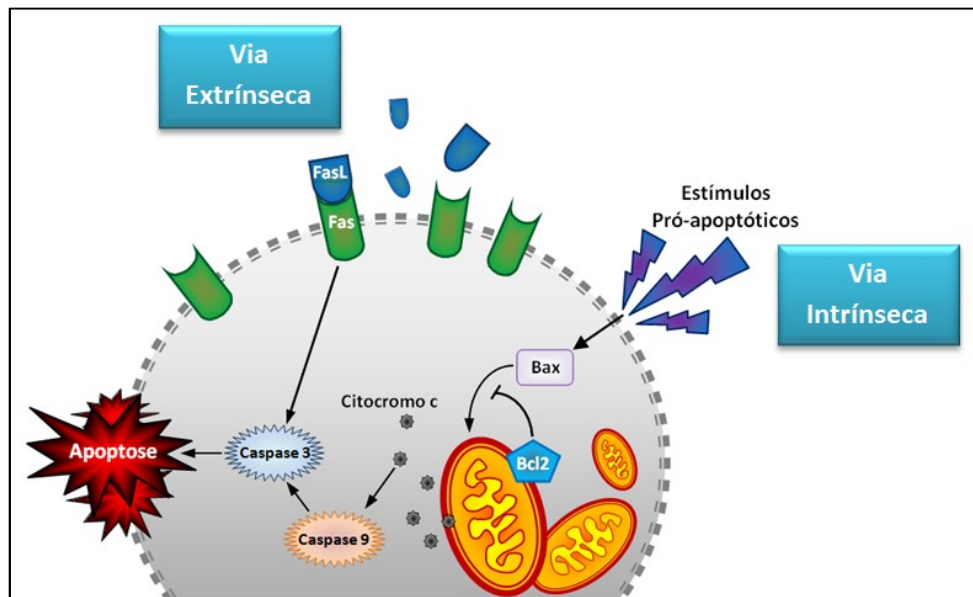
grupos estudados, quando as culturas atingiram 90% de confluência, embora alterações nos valores da produção de lactato têm sido encontradas. Em conjunto, as análises sugerem que a presença de outro metabólito presente no sobrenadante das culturas tende a evitar maiores quedas no pH.

Devido às diferentes condições de cultivo celular, fica inviável a quantificação conjunta dos dados em relação a um único controle. Dessa maneira, as futuras análises a serem apresentadas foram realizadas separando-se os grupos celulares em dois conjuntos: conjunto A, células A549 tratadas ou não com Ang-(1-7); conjunto B, células A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p, onde a puromicina se faz presente.

#### **4.5. Nível de expressão do mRNA de genes envolvidos no processo apoptótico**

Embora os diferentes processos tumorais sejam bastante distintos entre si, todos os tumores malignos possuem a capacidade de crescer além dos limites impostos às células normais e conseguem se esquivar do processo apoptótico (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). As evidências demonstram ainda que a resistência à apoptose seja uma das principais características da maioria dos tumores malignos (OKADA; MAK, 2004). Basicamente, a apoptose pode ocorrer através da via extrínseca ou intrínseca (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Conforme esquematizado na Figura 11, a via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos aos receptores Fas, membros da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases, levando a morte por apoptose (BUDIARDJO et al., 1999; DANIEL et al., 2001; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Por sua vez, a via intrínseca é ativada por estresses diversos, como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Estes sinais são transduzidos até as mitocôndrias, as quais liberam molécula pró-apoptóticas, como o citocromo c, no citoplasma (DESAGHER; MARTINOU, 2000; HENGARTNER, 2000), estimulando a ativação das caspase-9 e caspase-3 (GOTTLIEB; VANDER HEIDEN; THOMPSON, 2000; GOTTLIEB, 2001; PETROS; OLEJNICZAK; FESIK, 2004; RUPNARAIN et al., 2004) e, conseqüentemente, a apoptose celular.

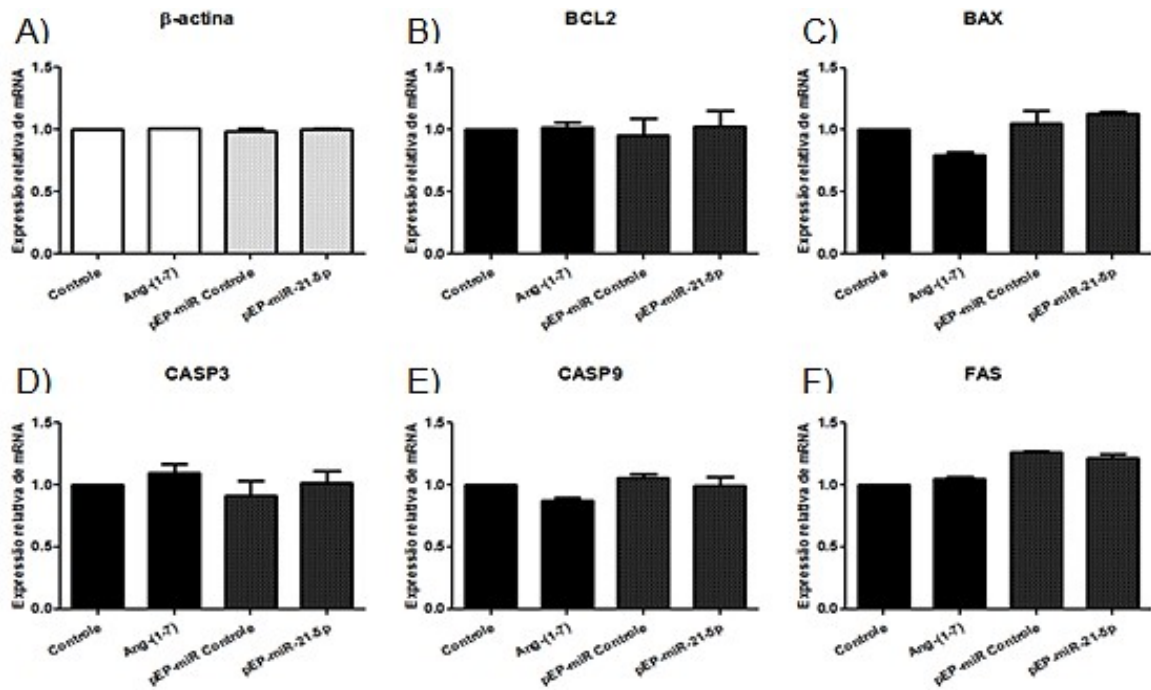
**Figura 11** – Representação esquemática das vias celulares, extrínseca e intrínseca, do processo apoptótico.



**Fonte:** Adaptação de Grivicich; Regner; Rocha, 2007; Lima (2016).

Em cada grupo celular, a expressão dos genes relacionados à apoptose celular (*bcl-2*, *bax*, *caspase 3*, *caspase 9* e *fas*) foi avaliada por PCR convencional (Figura 12). A quantificação da expressão relativa dos genes de interesse foi feita em relação à expressão do gene de referência *β-actina*.

**Figura 12** - Níveis de expressão do mRNA de  $\beta$ -actina e de genes envolvidos no processo de apoptose celular. Expressão relativa dos genes  $\beta$ -actina (A), *bcl2* (B), *bax* (C), *caspase 3* (D), *caspase 9* (E) e *fas* (F), nos grupos celulares controle, tratamento, A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, analisando-se separadamente os grupos na presença e ausência de puromicina. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  e \*\*\* $p \leq 0.001$ .



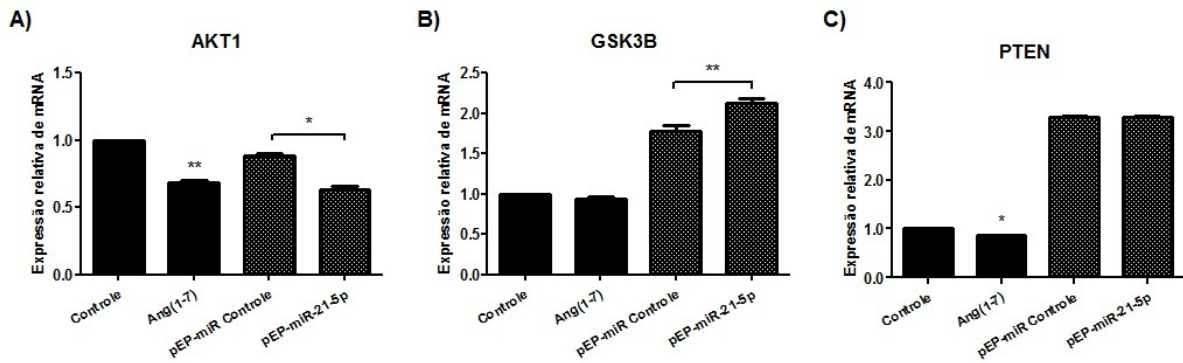
A partir da análise dos resultados, não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa no nível de expressão do mRNA dos genes avaliados. A ausência de alteração no nível de expressão dos genes em questão sugere que nenhuma das condições estudadas estimula a via apoptótica.

## 4.6. Análises de qPCR

### 4.6.1. Expressão de genes correlatos a via de PI3K/Akt

Dada a importância da via de PI3K/Akt no estabelecimento e desenvolvimento do processo tumoral, foram avaliadas a expressão relativa dos genes *akt1*, *gsk3 $\beta$* , e *pten*, em cada um dos grupos celulares estudados. Para isso, análises de qPCR foram realizadas e os resultados são apresentados na figura 13. Todas as análises dos níveis de expressão dos genes alvos foram normalizadas pelos níveis do controle endógeno  $\beta$ -actina.

**Figura 13** - Níveis de expressão do mRNAs de genes correlatos a via de PI3K/Akt. Expressão relativa dos genes *akt1* (A), *gsk3 $\beta$*  (B) e *pten* (C) nos grupos celulares controle, tratamento, A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, analisando-se separadamente os grupos na presença e ausência de puromicina. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  e \*\*\* $p \leq 0.001$ .



Os resultados apontam para a redução da expressão de *akt1* (Figura 13A) no grupo tratamento em relação ao controle. Interessantemente, o clone A549-pEP-miR-21-5p apresentou também, em menor intensidade, uma redução na expressão do gene *akt1*, em relação ao clone A549-pEP-miR-Controle. Sabe-se que a ativação da proteína Akt representa uma das etapas de maior relevância na via PI3K/Akt (MOCANU; YELLON, 2007) e é de extrema importância para o desenvolvimento tumoral (DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000; MCCUBREY et al., 2012). Os resultados apresentados sugerem um efeito modulador do peptídeo Ang-(1-7) na via PI3K/Akt, como reportado anteriormente (GIANI et al., 2007; SAMPAIO et al., 2007; DIAS-PEIXOTO et al., 2008; MUNOZ et al., 2010; THAN et al., 2013; GIANI et al., 2009; SANTOS, R. et al., 2013). A mesma observação pode ser posta para a superexpressão do miR-21-5p.

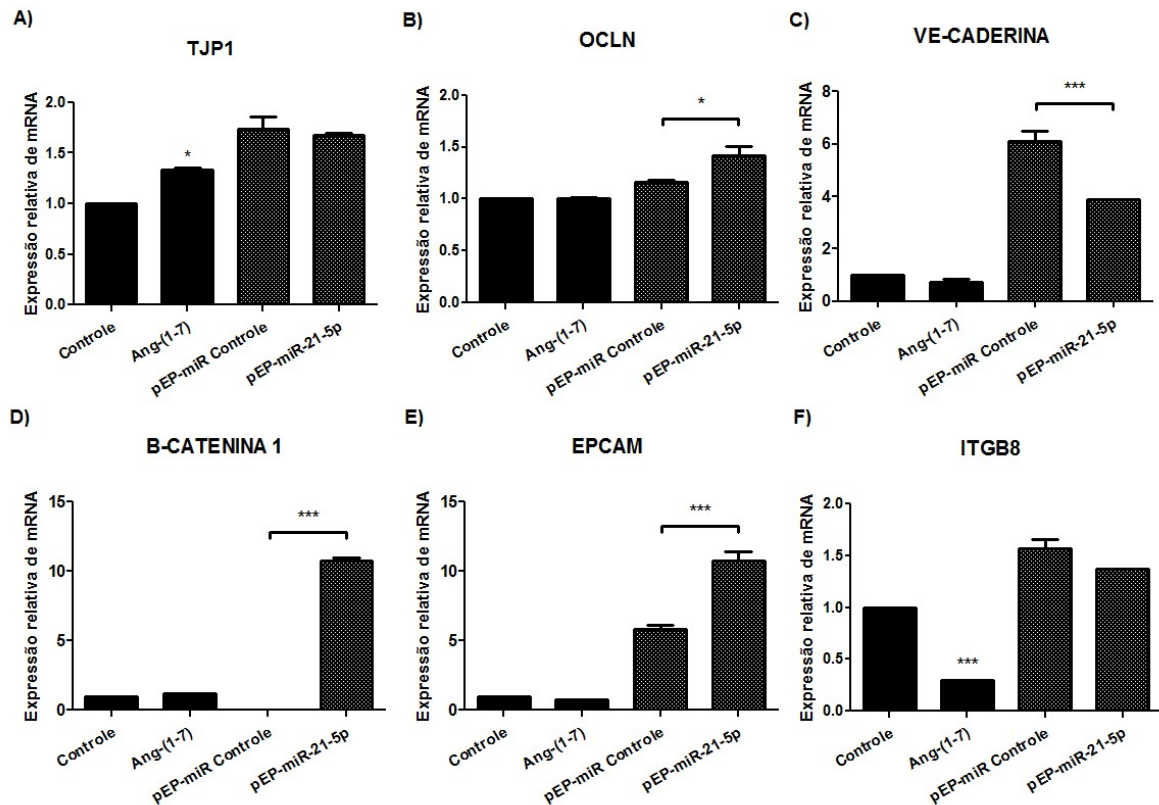
Por outro lado, o tratamento com Ang-(1-7) em nada alterou a expressão de *gsk3 $\beta$*  (Figura 13B) quando comparado ao grupo controle. Entretanto, a superexpressão do miRNA-21-5p resulta na maior expressão do gene *gsk3 $\beta$* . Na via de PI3K/Akt, Akt é o principal elemento responsável pela fosforilação e inativação de GSK3B (VINCENT et al., 2014), sendo que alguns autores sugeriram sua atuação na supressão da oncogênese (BAN et al., 2003; ZHENG et al., 2007; KANG et al., 2008; MISHRA, 2010; VINCENT et al., 2014). Assim, o aumento significativo nos níveis transcricionais de *gsk3 $\beta$*  no clone A549-pEP-miR-21-5p torna-se interessante, mas para maiores análises os níveis protéicos e funcionais da proteína GSK3B precisam ser melhor avaliados, mas os resultados sugerem a existência de regulação pós-transcricional.

Por sua vez, os níveis transcricionais de *pten* (Figura 13C) se apresentaram reduzido nos grupos tratamento em relação ao controle, enquanto não foi observada nenhuma alteração de expressão deste gene entre os clones estudados. A transcrição do gene e síntese da proteína PTEN são de muita importância para modulação da via PI3K/Akt (SIMPSON; PARSONS, 2001; TROTMAN et al., 2007; SUZUKI et al., 2008), que por sua vez modula o crescimento tumoral (DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000; MCCUBREY et al., 2012). Entretanto, análises preliminares desse trabalho, correlatos aos níveis de expressão da proteína PTEN em ensaios de *Western Blot* (dados não demonstrados), não demonstraram diferenças nos níveis de expressão da proteína, o que sugere uma meia vida diferente entre os níveis proteicos e do transcrito do gene *pten*. Certamente, a redução nos níveis do transcrito correlaciona-se com uma modulação pós-transcricional, visando o equilíbrio celular, frente ao tratamento realizado, considerando-se os efeitos do heptapeptídeos no controle do crescimento tumoral, como demonstrado em trabalhos anteriores (GALLAGHER; TALLANT, 2004; MENON et al., 2007; SANTOS; FERREIRA; SIMÕES e SILVA, 2008; SOTO-PANTOJA et al., 2009).

#### 4.6.2. Expressão de genes correlatos ao processo de adesão/ migração tumoral

Para se avaliar particularidades do processo de adesão e migração tumoral foram realizadas análises de qPCR para genes de interesse correlatos às interações célula-célula e célula-matriz (Figura 14), e ao processo de degradação da matriz extracelular (Figura 15). Esses genes modulam os processos de migração celular, angiogênese, invasão celular e metástase.

**Figura 14** - Níveis de expressão dos mRNAs de genes correlatos às interações célula-célula e célula matriz. Expressão relativa dos genes *tjp1* (A), *ocln* (B), *cdh5* (C), *ctnnb1* (D), *epcam* (E) e *itgb8* (F) nos grupos celulares controle, tratamento, A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, analisando-se separadamente os grupos na presença e ausência de puromicina. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  e \*\*\* $p \leq 0.001$ .



As análises de qPCR apresentadas na Figura 14 mostram particularidades na expressão dos genes investigados: *tjp1* (também denominado *zo-1*), *ocln*, *cdh5* (ou *VE-caderina*), *ctnnb1*, *epcam* e *itgb8*.

As análises da transcrição do gene *zo-1* são observadas na Figura 14A, mostrando que o tratamento com Ang-(1-7) resulta no aumento da expressão desse gene em relação ao grupo controle. As junções oclusivas são bem conhecidas por sua função especializada entre células adjacentes (RUNKLE; MU, 2013), oferecendo certa resistência contra a dissociação de células epiteliais. Neste contexto, tais junções representam a primeira barreira celular a ser vencida pelo câncer de modo a iniciar o processo metastático (MARTIN; MANSEL; JIANG, 2002). Estudos correlacionaram a redução na expressão de ZO-1 com aumento no processo de invasão de câncer do trato digestivo de humanos (KIMURA et al., 1997), câncer de mama (HOOVER; LIAO; BRYANT, 1998) e coloretal (KAIHARA et al., 2003). Ni, S. et al. (2013), observaram que os níveis de mRNA de *zo-1* são significativamente

baixos em NSCLC, sugerindo que os níveis de expressão de ZO-1 exerçam importante função na tumorigênese de NSCLC e seja indicativo do prognóstico do paciente. Neste contexto, sugere-se que o tratamento celular com Ang-(1-7) fortaleça as interações adesivas entre células adjacentes e dificulte o processo de dissociação celular, uma vez que foi observada um aumento nos níveis de expressão de *zo-1*. Para os clones pEP-miR não foram observadas alterações significativas nos níveis de expressão transcricional.

Como já mencionado anteriormente, o complexo de junções oclusivas consiste de interações entre proteínas transmembranas, como a Ocludina (OCLN), e proteínas intracelulares como a ZO-1. Sendo assim, a Figura 14B apresenta os níveis de expressão desse gene nos diferentes grupos A549 investigados. Embora nas células controle e tratamento com ang-(1-7) não tenham sido observadas alterações nos níveis de expressão do gene *ocln*, os níveis transcricionais desse gene são alterados nos clones pEP-miR. O clone A549-pEP-miR-21-5p apresenta maior expressão de *ocln*, quando da comparação com os níveis de expressão observados no clone A549-pEP-miR-Controle. Desde a sua descoberta, vários estudos foram conduzidos para determinar a função da ocludina (SÁNCHEZ-PULIDO et al., 2002; SCHULZKE et al., 2005; YU, A. et al., 2005; YU; TURNER, 2008; TORRES-FLORES; ARIAS, 2015), contudo, a literatura ainda é escassa de informações quanto a participação destas moléculas no processo de adesão, invasão e migração celular. Sabe-se que a metástase cerebral continua sendo um grave problema de importância clínica (WALKER; ROBINS; WEINFELD, 1985; WILHELM et al., 2013), e as interações entre células tumorais e a barreira sanguínea cerebral (BBB) precisam ser elucidadas. Nesse contexto, as junções oclusivas (ex.: ocludina) se inserem, entre as células endoteliais dos capilares cerebrais, proporcionando um ambiente fechado para o cérebro (JIA et al., 2014). Ge et al. (2015), estudando lesões cerebrais traumáticas (TBI) em ratos, mostrou que após as lesões ocorre um aumento nos níveis de miR-21, que por sua vez reduz a perda de expressão de ocludina induzidas por TBI. O presente trabalho, com modelo celular de câncer pulmonar, apresentou um aumento na expressão de *ocln* em células A549 que super-expressam o miR-21. Este resultado, assim como observado por Ge et al. (2015) sugere uma correlação direta entre níveis de miR-21 e expressão de *ocln*.

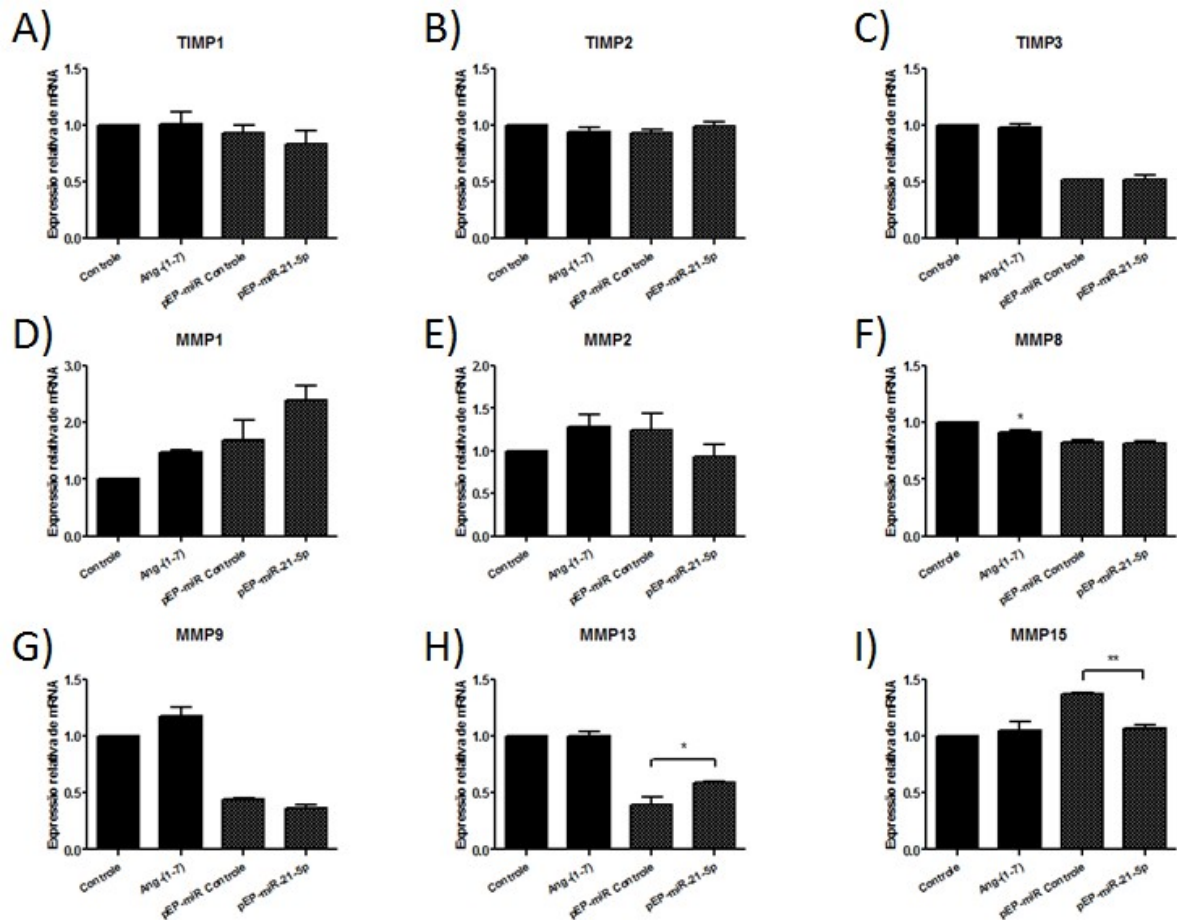
Além das junções oclusivas, existem ainda as junções aderentes, as quais são de extrema importância para a adesão célula-célula, além de atuar em várias vias de sinalização intracelular, e regulação da migração e proliferação celular (SOUZA, 2009). Um dos subtipos moleculares de junções aderentes é o complexo E-caderina/catenina (NIESSEN; GOTTARDI, 2008), o qual se associa ao citoesqueleto de actina e estabiliza a junção (SOUZA, 2009). Em relação às células endoteliais, o subtipo de caderina presente é a VE-caderina, a qual se liga intracelularmente a três tipos de cateninas, dentre elas a  $\beta$ -catenina (LAMPUGNANI et al, 1995). Assim como uma E-caderina, as VE-caderinas se associam lateralmente às células adjacentes por homodímeros dependentes de cálcio (SOUZA, 2009). A análise da expressão do gene *ve-caderina* nos grupos celulares, detectou uma redução significativa no clone A549-pEP-miR-21-5p, quando da comparação com a sua condição controle, pEP-miR-controle, (Figura 14C). Esses resultados vão ao encontro do que é observado na formação de carcinomas com a ocorrência de desestabilização das junções aderentes (GLOUSHANKOVA, 2008). Além disso, em outros estudos, vários autores demonstraram que a diminuição dos níveis de VE-caderina pode também acarretar na translocação de  $\beta$ -catenina para o núcleo, onde ocorreria a ativação de fatores transcricionais, induzindo eventos relacionados ao processo tumorigênico, como maior proliferação celular, resistência a apoptose e aumento do potencial invasivo (FUCHS et al, 2005; JEANES; GOTTARDI; YAP, 2008; SOUZA, 2009). Interessantemente, nossas análises também sugerem a presença desse mecanismo. Os níveis transcricionais de *ctnnb1* no clone A549-pEP-miR-21-5p (Figura 14D) apresentam-se, aproximadamente, 25 vezes maior em relação ao clone A549-pEP-miR-Controle, reforçando a importância da  $\beta$ -catenina na sinalização intracelular inerente à evolução do processo tumoral, e reforçando a atuação funcional do miR-21 como um elemento facilitador do metabolismo tumoral em nosso modelo celular. Paralelamente, nenhuma alteração foi observada nos grupos celulares controle e tratamento com o hepatopeptídeo.

Continuando as análises da expressão de elementos correlatos aos processos de adesão e migração celular, outro gene investigado e que apresentou elevada expressão em nossos ensaios foi o gene *epcam* (Figura 14E). Embora as culturas não transfectadas não tenham apresentado variação nos níveis transcricionais do gene, a expressão de *epcam* no clone A549-pEP-miR-21-5p foi consideravelmente maior ao observado no clone A549-pEP-miR-Controle. EPCAM se caracteriza como

uma molécula de adesão da célula epitelial, sendo uma glicoproteína transmembrana super-expressa na maioria dos carcinomas humanos (WENT et al., 2004). No desenvolvimento e progressão tumoral, EPCAM apresenta uma complexa função biológica (VAN DER GUN et al., 2010). Sendo uma molécula de adesão, EPCAM participa das interações homofílicas célula-célula, prevenindo assim a ocorrência de metástase (LITVINOV et al., 1994; MARTOWICZ et al., 2013). Por outro lado, sabe-se que EPCAM é capaz de anular a adesão célula-célula mediada pela E-caderina, promovendo assim a metástase (WINTER et al., 2003). Dada a relação existente entre EPCAM e o complexo E-caderina/catenina (MAETZEL et al., 2009), sugere-se que o aumento de expressão de mRNA de *epcam* no clone A549-pEP-miR-21-5p em relação ao grupo pEP-miR-Controle, esteja correlacionado à diminuição da expressão do gene da VE-Caderina e aumento nos níveis do gene  *$\beta$ -catenina1*, favorecendo a sinalização intracelular para o desenvolvimento tumoral.

Finalmente, a Figura 14F apresenta uma redução dos níveis de *itgb8* em células A549 tratadas Ang-(1-7), quando comparado ao grupo controle. As integrinas constituem uma família de receptores da superfície celular que mediam as interações célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC) (HYNES, 2002; MORGAN et al., 2007). Tais proteínas pertencem ao grupo de moléculas de adesão celular (CAMs) e são constituídas de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (GORDÓN-NUÑEZ et al., 2007). Integrina  $\beta 8$  é uma sub-unidade do complexo de integrinas e está codificada pelo gene *itgb8*, o qual apresentou reduzida expressão no grupo tratamento. Essa diminuição nos níveis de transcrito *itgb8* sugerem, mais uma vez, um efeito antiproliferativo e antitumoral da Ang-(1-7), visto que a expressão das integrinas contribuem para a sobrevivência das células cancerígenas, resistência à quimioterapia, angiogênese, migração e invasão celular (LAMB; ZARIF; MIRANTI, 2011; BIANCHI-SMIRAGLIA; PAESANTE; BAKIN, 2013; FERRAZ; FERNANDEZ, 2014). Nenhuma alteração significativa nos níveis de *itgb8* foram observadas nos clones pEP-miR.

**Figura 15** - Níveis de expressão dos mRNAs de genes correlatos à degradação da matriz extracelular. Expressão relativa dos genes *timp1* (A), *timp2* (B), *timp3* (C), *mmp1* (D), *mmp2* (E), *mmp8* (F), *mmp9* (G), *mmp13* (H) e *mmp15* (I) nos grupos celulares controle, tratamento, A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p. Para análise estatística foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, analisando-se separadamente os grupos na presença e ausência de puromicina. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  e \*\*\* $p \leq 0.001$ .



Além dos genes investigados e apresentados na Figura 14, os níveis de metaloproteinases de matriz (MMP), descritas como endopeptidase zinco-dependentes responsáveis pela degradação da matriz extracelular (ECM) e remodelação de tecidos (SINGH et al., 2015), também foram analisados. Estas enzimas são responsáveis por preparar estruturalmente o microambiente para o processo de migração celular e angiogênese, e podem ter sua atividade modulada pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) (HAMEEDALDEEN et al., 2014). As MMPs são classificadas em quatro subgrupos, baseados nos diferentes elementos alvos da ECM a serem degradados: colagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) degradam, principalmente, fibras de colágeno, as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) possuem a capacidade de degradar o produto resultante da desnaturação do colágeno, as estromelinas degradam fibronectinas e proteoglicanas, e as MMP

ligadas à membrana (MMP-15) apresentam um importante papel na ativação das outras MMP (WOESSNER, 1991; BIRKEDAL-HANSEN, 1995; IKI et al., 1999; HIDALGO; ECKHARDT, 2001; NABESHIMA et al., 2002; VISSE; NAGASE, 2003; SINGH et al., 2015). Assim, considerando-se a relevância dessas proteínas no processo metastático, as análises transcricionais de MMPs e dos genes de proteínas inibidoras das MMPs (TIMPS) foram realizadas e os resultados estão apresentados na Figura 15.

Dentre os genes analisados no presente estudo, apenas *MMP-8* (Figura 15F) apresentou uma redução nos níveis de expressão devido ao tratamento com Ang-(1-7), quando da comparação com a condição controle. Os clones pEP-miR não apresentaram variação estatisticamente significativa quando comparados entre si. Considerando-se o gene *MMP-8*, este codifica uma proteína caracterizada como uma colagenase, responsável por degradar colágeno intersticial tipos I, II e III, além de outras moléculas da MEC (BIRKEDAL-HANSEN, 1995; KERKELA; SAARIALHO-KERE, 2003). Neste contexto, os resultados corroboram o efeito protetor do heptapeptídeo, sugerindo que o mesmo esteja relacionado na inibição da degradação da ECM e, assim, dificultando o processo de migração celular.

Por sua vez, a super-expressão do miR-21-5p resultou em alterações nos níveis transcricionais de MMP-13 e MMP-15 (Figura 15H e 15I). A análise dos resultados apresenta um aumento nos níveis transcricionais de MMP13 no clone A549-pEP-miR-21-5p em relação ao clone controle, sugerindo uma modulação positiva da expressão da colagenase MMP-13 pela super-expressão do miR-21-5p (Figura 15H). Esses resultados fortalecem a hipótese de que a atuação do miR-21-5p possa intensificar o processo migratório de células cancerígenas. Já, os níveis transcricionais de MMP15 (Figura 15I) apresentaram-se reduzidos no clone A549-pEP-miR-21-5p em relação ao A549-pEP-miR-Controle. O resultado encontrado vai contra os dados da literatura, os quais dizem que altos níveis desta metaloproteinase estão diretamente relacionados com invasão celular e resistência à apoptose (UENO et al., 1997; TIBSHIRANI et al., 2002; JACKSON et al., 2003; ABRAHAM, et al., 2005). Entretanto, se fizermos uma análise estatística ONE-Way ANOVA, seguida do teste de tukey entre os níveis de expressão da MMP-15 nos diferentes grupos celulares (controle e tratamentos), observa-se que os níveis de expressão do gene em questão assemelha-se aos níveis de expressão do clone pEP-miR-21. Podemos sugerir que um mecanismo inerente ao tipo celular module

os níveis transcricionais de MMP-15. Com relação aos níveis de expressão das TIMPs, nenhuma alteração significativa foi observada.

Conjuntamente, a análise dos resultados de qPCR sugere o efeito do peptídeo Ang-(1-7) na modulação de mRNA de genes correlatos ao processo de adesão (*tjp1*), invasão (*itgb8*) e migração celular (*MMP-8*).

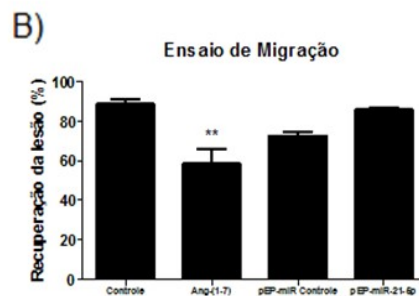
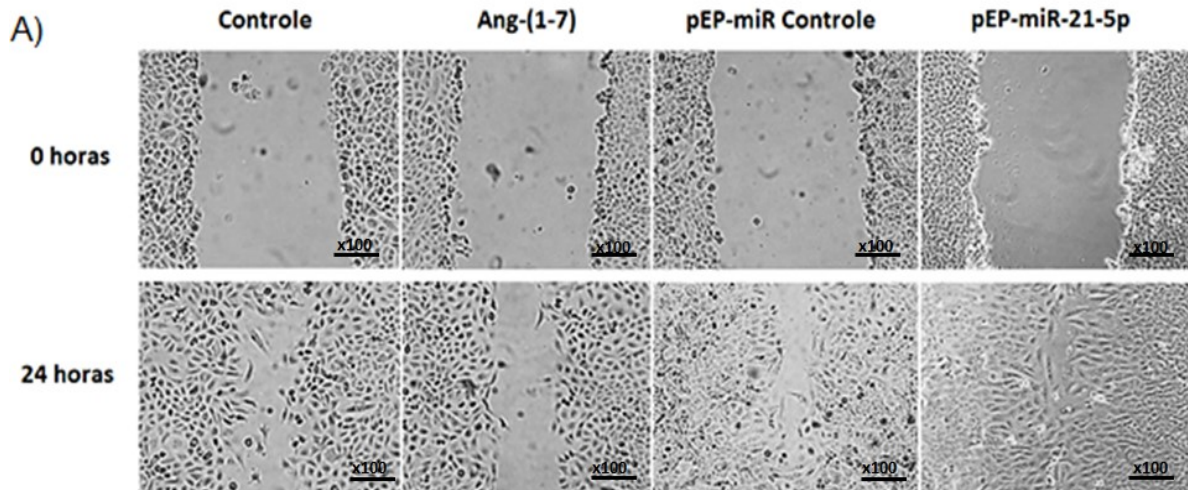
#### **4.7. Análises fisiológicas**

Para se avaliar particularidades da fisiologia celular das células A549 nos diferentes grupos, foram realizados ensaios investigativos do padrão de migração e invasão celular, além da quantificação da atividade enzimática de gelatinaes envolvidas na degradação de ECM.

##### **4.7.1. Controle da migração celular pela Ang-(1-7)**

O ensaio de migração celular foi realizado de modo a mensurar a capacidade migratória de cada um dos grupos celulares analisados. Este ensaio é uma adaptação do que foi descrito por Straatman (2008) e os resultados estão apresentados na Figura 16.

**Figura 16 – Ensaio de Migração Celular.** (A) Foi simulado uma lesão na monocamada de células A549 dos grupos controle, tratamento, A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p crescidas até 90% de confluência, e as imagens foram adquiridas nos tempos 0 e 24 horas. (B) Quantificação da recuperação das áreas lesionadas após um período de 24 horas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste *One-Way ANOVA* com pós-teste de Dunnett, analisando-se separadamente os grupos na presença e ausência de puromicina. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .



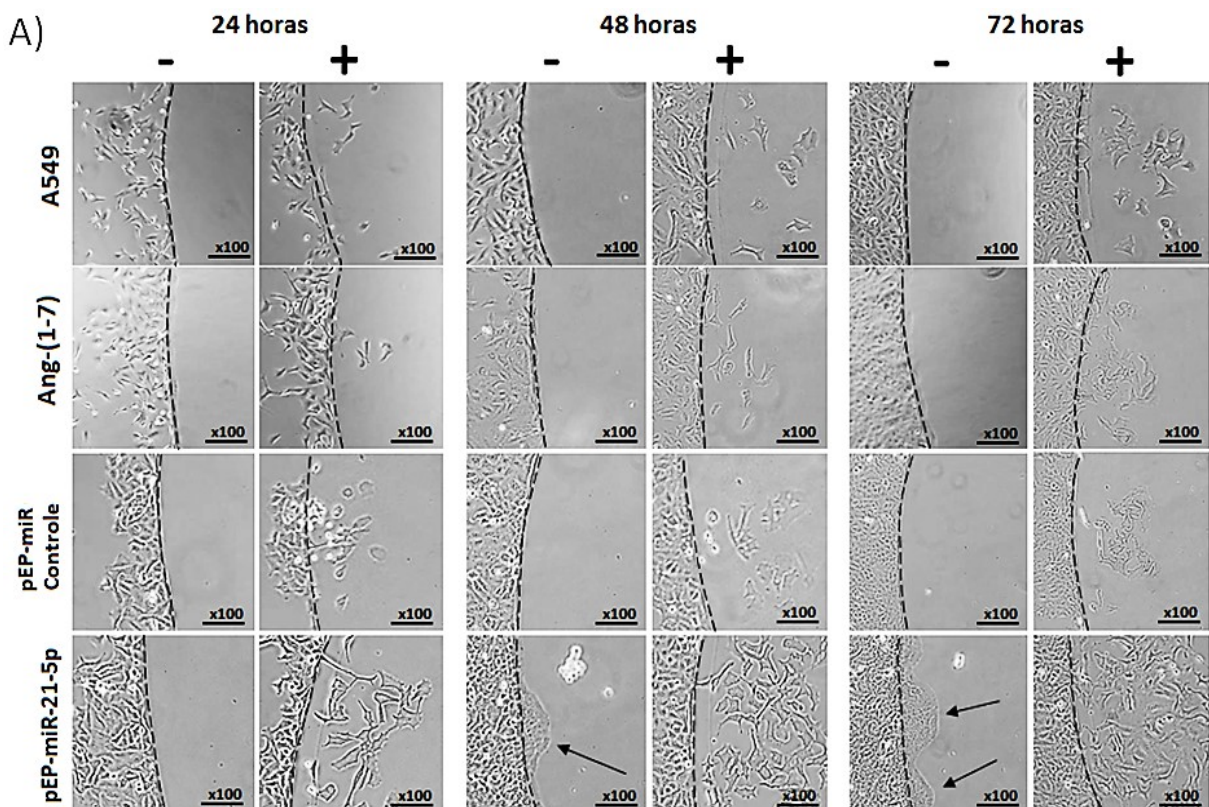
Os resultados apresentados mostram que, após o período de 24 horas, o peptídeo Ang-(1-7) tem a capacidade de reduzir em até 20% a taxa de migração de células A549, quando comparado ao grupo controle (90% de recuperação da área lesada), sugerindo o potencial terapêutico do heptapeptídeo no tratamento da disseminação do câncer. Nossos resultados corroboram o dados de Ni et al. (2012), o qual demonstrou o efeito anti-metastático da Ang-(1-7) em células A549 por observar a ação inibitória do peptídeo sobre mecanismos de migração e invasão.

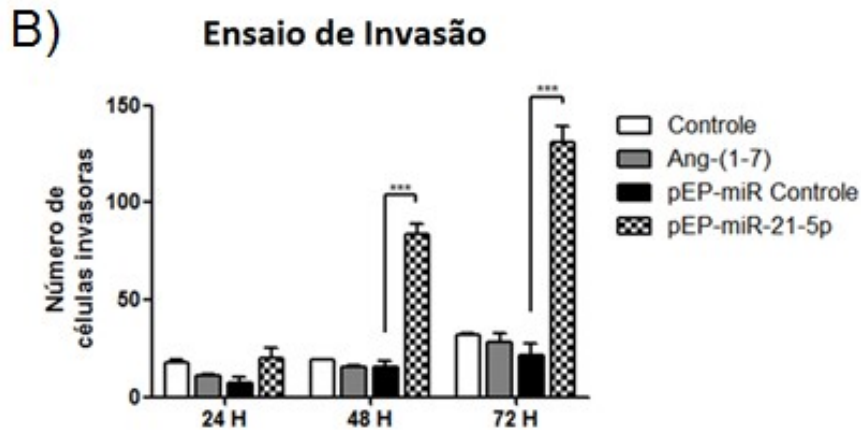
A taxa de migração celular observada nos grupos A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p (75% e 90%, respectivamente, de recuperação da área lesada) foi similar ao encontrado no grupo controle, entretanto as análises quantitativas não evidenciaram diferença estatística entre os clones estudados.

#### 4.7.2. Potencialização da capacidade invasiva pela superexpressão do miR-21-5p

Complementando os resultados de migração celular, foram realizados ensaios para avaliar-se o potencial invasivo das células A549 em cada um dos grupos estudados. Para tanto, adaptou-se a metodologia descrita por Wiggins e Rappoport (2010) a qual permite a análise do potencial invasivo celular sobre superfícies planas e pode ter suas condições experimentais alteradas de modo a serem realizadas múltiplas análises de interesse. Os resultados estão apresentados na figura 17.

**Figura 17** - Ensaio de Invasão Celular. Análise do potencial invasivo de células A549 dos grupos controle, tratamento, A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p, através do ensaio de gota de agarose. (A) Imagens de microscopia de contraste de fase (x100) das células A549 migrando por debaixo das gotas de agarose diluídas em PBS (controle negativo) ou DMEN/F12 10% SFB (controle positivo); as imagens foram adquiridas em intervalos regulares de 24 horas, ao longo de 72 horas. O processo de invasão está representado da esquerda para direita, através do limite da gota de agarose delimitado pela linha pontilhada. As setas apontam para um grupo de células invasoras observadas no controle negativo do clone A549-pEP-miR-21-5p. (B) Quantidade de células invasoras, em cada grupo estudado, que migraram por debaixo das gotas de agarose. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste *Two-Way ANOVA*. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  e \*\*\* $p \leq 0.001$ .





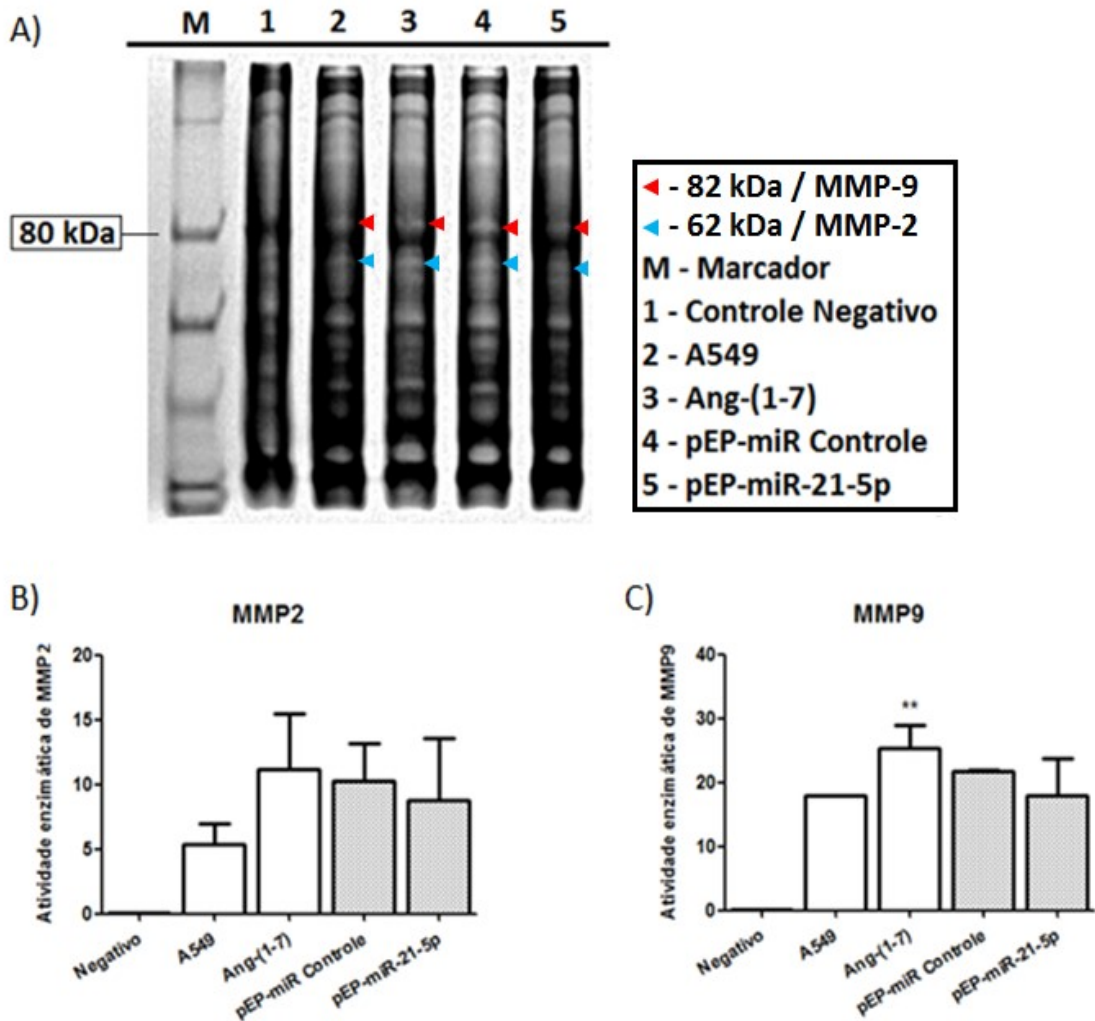
A partir da análise dos resultados do ensaio de invasão, é possível inferir que a super-expressão do miR-21-5p aumenta significativamente o potencial invasivo das células A549. A primeira diferença marcante foi vista após 48 horas de ensaio, onde o número de células invasoras quadruplicou em relação ao grupo A549-pEP-miR-Controle. Após 72 horas de ensaio, o número de células invasoras foi, aproximadamente, seis vezes a quantidade do clone controle. A correlação entre expressão do miR-21-5p e o potencial invasivo das células A549 é reforçada pela observação das massas de células invasoras (sinalizados pela setas) no controle negativo do ensaio após 48 horas e 72 horas de incubação. Não foi observada nenhuma outra alteração significativa entre os outros grupos estudados.

Sendo o processo de invasão celular de extrema relevância para o estabelecimento da metástase, o presente resultado corrobora os achados de Markou et al. (2008), Zhang, J. et al. (2010) e Wei et al. (2011), onde foi apontado a correlação existente entre a elevação nos níveis de miR-21-5p em neoplasias pulmonares com o estabelecimento de metástase tumoral. Entretanto, sabe-se que outros eventos são necessários para o estabelecimento do processo metastático, sendo necessário a realização de ensaios complementares para uma correlação mais precisa entre os níveis de miRNA e a disseminação de células cancerosas. Nesse ponto, podemos sugerir, que os efeitos inibidores do crescimento de células tumorais pelo peptídeos Ang-(1-7), deve-se a atuação conjunta de vários miRNAs, que possivelmente atuam controlando os efeitos adversos do miR-21-5p no processo metastático.

#### 4.7.3. Quantificação da atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9

Como mencionado anteriormente, as metaloproteinases de matriz são enzimas de extrema importância no processo de degradação e remodelação de ECM (SINGH et al., 2015), necessários para estruturação do ambiente tumoral e, conseqüentemente, ocorrência de migração celular e angiogênese (HAMEEDALDEEN et al., 2014). Dentre as MMPs, MMP-2 e MMP-9 são responsáveis pela degradação do colágeno tipo IV, sendo esse o maior componente da membrana basal, sugerindo um papel crítico destas duas MMPs para o potencial invasivo e metastático do câncer pulmonar (THOMAS; KHOKHA, 2000; PARKS; SHAPIRO, 2001). Neste contexto, o ensaio de zimografia visa quantificar a atividade enzimática das gelatinases MMP-2 e MMP-9 presentes nos extratos celulares dos respectivos grupos analisados (Figura 18).

**Figura 18** - Ensaio de Zimografia. (A) Extratos celulares de A549 acrescido de inibidor de protease (controle negativo), A549 crescidas na ausência de Ang-(1-7) (A549 / controle) e em presença do heptapeptídeo [Ang-(1-7) / tratamento], e dos clones A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p, lisados e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, enriquecido de gelatina 1%; Os halos específicos foram utilizados na quantificação da atividade enzimática da MMP2 (B) e MMP9 (C). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett analisando-se separadamente os grupos na presença e ausência de puromicina. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  e \*\*\* $p \leq 0.001$ .



A presença do inibidor de protease no extrato do controle experimental negativo inibiu de tal forma ação das gelatinases, que não foi possível detectar com clareza os halos específicos referentes à degradação do substrato (gelatina / Sigma - Aldrich®), presente no gel de poliacrilamida, pela MMP-2 e MMP-9.

Não foi detectada nenhuma alteração significativa na análise dos níveis de expressão da MMP-2 (62 kDa), entre os grupos celulares estudados. Em contrapartida, o nível de MMP-9 (82 kDa) expresso no grupo tratamento apresentou-

se maior em relação ao grupo controle, mostrando uma influência da Ang-(1-7) na modulação da atividade enzimática desta metaloproteinase.

Em contraste com o presente resultado, as MMP-9 e MMP-2 apresentam forte expressão em tecido de câncer de mama comparado ao tecido normal (KOHRMANN et al., 2009). Por sua vez, a MMP-9 é capaz de degradar a ECM do tecido circundante ao tumor, apresentando uma relação estreita com o processo de invasão e metástase tumoral (PEI et al., 2015). Outro estudo com metástase pulmonar (GILKES; SEMENZA; WIRTZ, 2014), evidencia o papel chave da MMP-9 na formação do ambiente metastático, através da sua super-expressão. Desta forma, o resultado de zimografia sugere que o peptídeo Ang-(1-7) estimula a atividade da MMP-9 nas células A549, o que se caracteriza negativo para o controle do crescimento tumoral. Entretanto, uma miríade de interações moleculares que se inter cruzam acontece no processo metastático, e a inibição do crescimento do tumor pelo heptapeptídeo é certamente complexa e não somente dependente da ativação da MMP-9. Existem ainda poucos dados disponíveis a respeito do efeito de Ang-(1-7), e seu receptor Mas, na atividade de metaloproteinases (Gava et al., 2012), entretanto, os dados existentes apontam para um efeito contrário ao observado no presente estudo. Um estudo conduzido por Ni et al. (2012) demonstrou que a presença da Ang-(1-7) inibiu a atividade enzimática de MMP-9 em células A549, reduzindo a migração e invasão celular. Existe ainda a evidência de que, ao contrário da Ang-II, o tratamento com Ang-(1-7) leva à diminuição das taxas de expressão de MMPs e TIMPs em cardiomiócitos humanos (PAN; WEN; LIN, 2009). Com isso, se faz necessária a complementação do presente estudo, visando a compreensão do fato que o tratamento celular de A549 com Ang-(1-7) aumenta a atividade enzimática da gelatinase MMP-9.

## 5. CONCLUSÃO

Cânceres estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todo mundo, sendo o câncer de pulmão de extrema importância epidemiológica (WHO, 2015). Dentre as novas estratégias terapêuticas, a utilização do heptapeptídeo angiotensina-(1-7), originado do SRA, tem se mostrado bastante promissora no tratamento tumoral (SANTOS; FERREIRA; SIMÕES e SILVA, 2008; ROSENTHAL et al., 2009; HANIF et al., 2010; GALLAGHER et al., 2011). Ainda no contexto de processos patológicos, os microRNAs se destacam na capacidade regulatória de vias intrínsecas a processos de proliferação, adesão, migração e invasão celular tumoral (BARTEL, 2004; CHENG et al., 2005; DRESIOS et al., 2005; HAYES et al., 2014; KIM et al., 2014). Desta forma, o presente trabalho buscou analisar de forma comparativa os efeitos moleculares causados pelo tratamento de células A549 com o heptapeptídeo Ang-(1-7), em relação à super-expressão do miR-21-5p nesta linhagem tumoral.

Os resultados apontaram, inicialmente, que a concentração de  $10^{-7}$  M de Angiotensina-(1-7) utilizada no tratamento de células A549 não alterou a viabilidade celular. Além disso, as condições de cultivo celular utilizadas nos grupos estudados (controle, tratamento, A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p) não desencadeou alterações no padrão de expressão de genes correlatos ao processo apoptótico.

A presença da Ang-(1-7) prolongou o intervalo de tempo para duplicação celular em 22%, quando comparado ao grupo controle crescido na ausência do peptídeo, sugerindo que a Ang-(1-7) seja capaz de regular negativamente os mecanismos de proliferação celular tumoral. Entretanto, as análises bioquímicas revelaram que o peptídeo estimula a síntese de lactato em células A549 controle. Estudos mostraram que o lactato pode ser utilizado como combustível metabólico alternativo pelas células tumorais (SONVEAUX et al., 2008; FERON, 2009; WHITAKER-MENEZES et al., 2011), indicando que a presença da Ang-(1-7) modula o metabolismo e o desenvolvimento tumoral. Os resultados mostraram também que a presença da puromicina no meio de cultura dos clones A549-pEP-miR-Controle e A549-pEP-miR-21-5p aumentou a síntese de lactato, evidenciando um estresse celular decorrente da presença do antibiótico.

Em relação às análises de expressão gênica, os resultados das qPCRs para os genes correlatos a via de PI3K/Akt, mostraram que a expressão de *akt1* no grupo tratamento é inferior ao controle, assim como o nível de expressão deste gene no clone A549-pEP-miR-21-5p é menor ao apresentado pelo grupo A549-pEP-miR-controle, sugerindo um efeito protetor do peptídeo Ang-(1-7) na inibição da via PI3K/Akt. Análises complementares também poderão explicar a provável existência de uma modulação pós-transcricional dos níveis de pten no grupo tratado com o peptídeo Ang-(1-7), considerando-se o papel da proteína PTEN na modulação do processo tumoral.

A análise dos genes correlatos ao processo de adesão e migração celular evidenciou o papel da Ang-(1-7) no fortalecimento das junções celulares através do aumento na expressão de genes envolvidos nos mecanismos de adesão celular (*tjp1*) e inibição de mecanismos de invasão e migração (*itgb8* e *MMP-8*, respectivamente). Os resultados sugeriram ainda uma relação direta entre nível de expressão do miR-21 com o mRNA de *ocln*. Ainda, as análises apresentaram uma redução nos níveis de *ve-caderina* e aumento nos níveis de *β-catenina* no grupo A549-pEP-miR-21-5p o que sugere uma desestabilização das junções aderentes e ativação da sinalização celular tumoral, respectivamente. Os níveis de *epcam* encontrados podem estar relacionados à expressão dos genes responsáveis pela formação do complexo E-caderina/catenina. Futuras análises complementares poderão elucidar melhor os níveis transcricionais de *MMP-15*, uma vez que os mesmos não são corroborados pela literatura.

As análises dos resultados referentes aos ensaios de migração e invasão celular reforçam o efeito do peptídeo Ang-(1-7) na redução da taxa de migração celular, e do miR-21-5p no aumento do potencial invasivo de células A549. Esses dados sugerem o potencial terapêutico do heptapeptídeo no tratamento da disseminação do câncer de pulmão, e reforçam que um único miRNA, mesmo que sendo considerado como oncomiR, não é suficiente para a modulação positiva do processo metastático. Além disso, os resultados de zimografia sugerem, pelo aumento na atividade enzimática de MMP-9, que o peptídeo parece de alguma forma favorecer o processo invasivo celular em A549. Esse fato se opõe as limitadas informações existentes na literatura referente à ação da Ang-(1-7) na ação de gelatinases, sendo necessário completar esse estudo para melhor compreensão do resultado apresentado.

De maneira geral, baseado neste estudo e em outros realizados por diferentes autores (CHIEN et al., 2009; NI, L. et al., 2012), o peptídeo Ang-(1-7) se apresenta como potencial agente terapêutico no controle da migração celular tumoral. As análises em conjunto dos resultados aqui apresentados sugerem uma modulação favorável de diferentes elementos no controle da invasão e metástase em nosso modelo celular. Entretanto, o miR-21-5p, elemento classicamente descrito como um onco-miR, apresenta-se com expressão elevada em células tratadas com o heptapeptídeo. A partir dessa análise decidimos avaliar o papel do miRNA-21, de maneira sistêmica, nas culturas celulares de A549 e corroboramos o seu papel ativador do processo tumoral. Pontualmente, a superexpressão do miR-21-5p em células A549 apontou o efeito deste microRNA na potencialização dos mecanismos de migração e invasão celular, visto o conjunto dos resultados apresentados. Dessa maneira, podemos afirmar que embora a própria angiotensina-(1-7) atue promovendo a expressão do miR-21, o heptapeptídeo seja responsável, também, pela modulação da expressão conjunta de outros elementos, resultando no controle do crescimento, migração e invasão de células tumorais. Assim sendo, futuras análises que investiguem os efeitos de ativação transcricional cruzada de moléculas poderão subsidiar um maior entendimento dos mecanismos de ação do peptídeo nas células tumorais.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, R.; SCHÄFER, J.; ROTHE, M.; BANGE, J.; KNYAZEVA, P.; ULLRICH, A. Identification of MMP-15 as an anti-apoptotic factor in cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 40, p. 34123-34132, 2005.
- AL MOUSTAFA, A.; KASSAB, A.; DARNEL, A.; YASMEEN, A. High-risk HPV/ErbB-2 interaction on E-Cadherin/Catenin regulation in human carcinogenesis. **Curr. Pharm. Des.**, v. 14, n. 22, p. 2159-2172, 2008.
- AUPERIN, A.; LE PECHOUX, C.; ROLLAND, E.; CURRAN, W. J.; FURUSE, K.; FOURNEL, P.; BELDERBOS, J.; CLAMON, G.; ULUTIN, H. C.; PAULUS, R.; YAMANAKA, T.; BOZONNAT, M. C.; UITTERHOEVE, A.; WANG, X.; STEWART, L.; ARRIAGADA, R.; BURDETT, S.; PIGNON, J. P. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 28, n. 13, p. 2181-2190, 2010.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1995. 900 p.
- BALDA, M. S.; MATTER, K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. **EMBO J.**, v. 19, n. 9, p. 2024-2033, 2000.
- BECKER, L. K.; ETELVINO, G. M.; WALTHER, T.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 293, p. H1416-H1424, 2007.
- BIANCHI-SMIRAGLIA, A.; PAESANTE, S.; BAKIN, A. V. Integrin  $\beta 5$  contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells through the Src-FAK and MEK-ERK signaling pathways. **Oncogene**, v. 32, n. 25, p. 3049-3058, 2013.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 7, n. 5, p. 728-735, 1995.
- BOIM, M. A.; ZATZ, R.; TEIXEIRA, V. P. C. Modulação humoral da função renal. In: ZATZ, R.; SEGURO, A. C.; MALNIC, G. **Bases fisiológicas da nefrologia**. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 25-43.
- BRADLEY, H. L.; HAWLEY, T. S.; BUNTING, K. D. Cell intrinsic defects in cytokine responsiveness of STAT5-deficient hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 100, n. 12, p. 3983-3989, 2002.
- BRAUN-MENENDEZ, E. J.; PAGE, I. H. Suggested revision of nomenclature: angiotensin. **Science**, v. 127, n. 3292, p. 242, 1958.

BREMNES, R. M.; VEVE, R.; HIRSCH, F. R.; FRANKLIN, W. A. The e-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. **Lung Cancer**, v. 36, n. 2, p. 115-124, 2002.

BUDIHARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 15, p. 269-290, 1999.

BYERS, L. A.; RUDIN, C. M. Small cell lung cancer: where do we go from here? **Cancer**, v. 121, n. 5, p. 664-672, 2015.

CAMPBELL, D. J. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 35, n. 6, p. 784-791, 2003.

CARBONE, D. P.; FELIP, E. Adjuvant therapy in non-small cell lung cancer: future treatment prospects and paradigms. **Clin. Lung Cancer**, v. 12, n. 5, p. 261-271, 2011.

CASTRO, C. H. **Avaliação dos efeitos da angiotensina-(1-7) e do seu receptor Mas no controle da função cardíaca utilizando animais geneticamente modificados**. 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CHAKRABORTI, S.; MANDAL, M.; DAS, S.; MANDAL, A.; CHAKRABORTI, T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. **Mol. Cell Biochem.**, v. 253, n. 1/2, p. 269-285, 2003.

CHAN, A. O. E-cadherin in gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, v. 12, n. 2, p. 199-203, 2006.

CHANSEL, D.; VANDERMEERSCH, S.; OKO, A.; CURAT, C.; ARDAILLOU, R. Effects of angiotensin IV and angiotensin-(1-7) on basal and angiotensin II-stimulated cytosolic Ca<sup>2+</sup> in mesangial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 414, n. 2/3, p. 165-175, 2001.

CHARALABOPOULOS, K.; GOGALI, A.; KOSTOULA, O. K.; CONSTANTOPOULOS, S. H. Cadherin superfamily of adhesion molecules in primary lung cancer. **Exp. Oncol.**, v. 26, n. 4, p. 256-260, 2004.

CHEN, P. Y.; MANNINGA, H.; SLANCHEV, K.; CHIEN, M.; RUSSO, J. J.; JU, J.; SHERIDAN, R.; JOHN, B.; MARKS, D. S.; GAIDATZIS, D.; SANDER, C.; ZAVOLAN, M.; TUSCHL, T. The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning. **Genes Dev.**, v. 19, n. 11, p. 1288-1293, 2005.

CHENG, A. M.; BYROM, M. W.; SHELTON, J.; FORD, L. P. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, n. 4, p.1290-1297, 2005.

CHENG, Y.; ZHANG, C. MicroRNA-21 in cardiovascular disease. **J. Cardiovasc. Trans. Res.**, v. 3, n. 3, p. 251-255, 2010.

CHIEN, C. S.; SHEN, K. H.; HUANG, J. S.; KO, S. C.; SHIH, Y. W. Antimetastatic potential of fisetin involves inactivation of the PI3K/Akt and JNK signaling pathways with downregulation of MMP-2/9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. **Mol. Cell Biochem.**, v. 333, n. 1/2, p. 169-180, 2009.

COATES, D. The angiotensin converting enzyme (ACE). **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 35, n. 6, p. 69-73, 2003.

COHEN, A. J.; FRANKLIN, W. A.; MAGILL, C.; SORENSON, J.; MILLER, Y. E. Low neutral endopeptidase levels in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 159, n. 3, p. 907-910, 1999.

CROSS, D. A.; CULBERT, A. A.; CHALMERS, K. A.; FACCI, L.; SKAPER, S. D.; REITH, A. D. Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. **J. Neurochem.**, v. 77, n. 1, p. 94-102, 2001.

DANIEL, P. T.; WIDER, T.; STURM, I.; SCHULZE-OSTHOFF, K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**, v. 15, n. 7, p. 1022-1032, 2001.

DEMPKE, W. C.; EDVARDSEN, K.; LU, S.; REINMUTH, N.; RECK, M.; INOUE, A. Brain metastases in NSCLC - are TKIs changing the treatment strategy? **Anticancer Res.**, v. 35, n. 11, p. 5797-5806, 2015.

DENKO, N. C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, n. 9, p. 705-713, 2008.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.**, v. 10, n. 9, p. 369-377, 2000.

DI CRISTOFANO, A.; PANDOLFI, P. P. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. **Cell**, v. 100, n. 4, p. 387-390, 2000.

DIAS-PEIXOTO, M. F.; SANTOS, R. A.; GOMES, E. R.; ALVES, M. N.; ALMEIDA, P. W.; GRECO, L.; ROSA, M.; FAULER, B.; BADER, M.; ALENINA, N.; GUATIMOSIM, S. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. **Hypertension**, v. 52, n. 3, p. 542-548, 2008.

DIMOÛ, A.; PAPADIMITRAKOPOULOU, V. Non-small cell lung cancer beyond biomarkers: the evolving landscape of clinical trial design. **J. Pers. Med.**, v. 4, n. 3, p. 386-401, 2014.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circ. Res.**, v. 87, n. 5, p. E1-E9, 2000.

- DRAOUI, N.; FERON, O. Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. **Dis. Model Mech.**, v. 4, n. 6, p. 727-732, 2011.
- DZAU, V. J.; BURT, D. W.; PRATT, R. E. Molecular biology of the renin-angiotensin system. **Am. J. Physiol.**, v. 255, n. 4, pt. 2, p. F563-F573, 1988.
- EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161-174, 2002.
- ETTINGER, D. S.; AISNER, J. Changing face of small-cell lung cancer: real and artifact. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, n. 28, p. 4526-4527, 2006.
- FENG, Y.; WAN, H.; LIU, J.; ZHANG, R.; MA, Q.; HAN, B.; XIANG, Y.; CHE, J.; CAO, H.; FEI, X.; QIU, W. The angiotensin-converting enzyme 2 in tumor growth and tumor-associated angiogenesis in non-small cell lung cancer. **Oncol. Rep.**, v. 23, n. 4, p. 941-948, 2010.
- FENG, Y.; NI, L.; WAN, H.; FAN, L.; FEI, X.; MA, Q.; GAO, B.; XIANG, Y.; CHE, J.; LI, Q. Overexpression of ACE2 produces antitumor effects via inhibition of angiogenesis and tumor cell invasion in vivo and in vitro. **Oncol. Rep.**, v. 26, n. 5, p. 1157-1164, 2011.
- FERON, O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. **Radiother. Oncol.**, v. 92, n. 3, p. 329-333, 2009.
- FERRARIO, C. M. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. **Hypertension**, v. 47, n. 3, p. 515-521, 2006.
- FERRAZ, F. B.; FERNANDEZ, J. H. Integrinas na adesão, migração e sinalização celular: associação com patologias e estudos clínicos. **Rev. Cient. FMC**, v. 9, n. 2, p. 25-34, 2014.
- FIDLER, I. J. The organ microenvironment and cancer metastasis. **Differentiation**, v. 70, n. 9/10, p. 498-505, 2002.
- FLEMING, I.; KOHLSTEDT, K.; BUSSE, R. New fACEs to the renin-angiotensin system. **Physiology**, v. 20, p. 91-95, 2005.
- FRESNO VARA, J. A.; CASADO, E.; DE CASTRO, J.; CEJAS, P.; BELDA-INIESTA, C.; GONZÁLEZ-BARÓN, M. PI3K/AKT signaling pathway and cancer. **Cancer Treat. Rev.**, v. 30, n. 2, p. 193-204, 2004.
- FUCHS, S. Y.; OUGOLKOV, A. V.; SPIEGELMAN, V. S.; MINAMOTO, T. Oncogenic  $\beta$ -catenin signaling networks in colorectal cancer. **Cell Cycle**, v. 4, n. 11, p. 1522-1539, 2005.

FUKUOKA, M.; WU, Y. L.; THONGPRASERT, S.; SUNPAWERAVONG, P.; LEONG, S. S.; SRIURANPONG, V.; CHAO, T. Y.; NAKAGAWA, K.; CHU, D. T.; SAIJO, N.; DUFFIELD, E. L.; RUKAZENKOV, Y.; SPEAKE, G.; JIANG, H.; ARMOUR, A. A.; TO, K. F.; YANG, J. C.; MOK, T. S. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). **J. Clin. Oncol.**, v. 29, n. 21, p. 2866-2874, 2011.

GALLAGHER, P. E.; TALLANT, E. A. Inhibition of lung cancer cell growth by angiotensin(1-7). **Carcinogenesis**, v. 25, n. 11, p. 2045-2052, 2004.

GALLAGHER, P. E.; COOK, K.; SOTO-PANTOJA, D.; MENON, J.; TALLANT, E. A. Angiotensin peptides and cancer. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 11, n. 4, p. 394-404, 2011.

GAVA, E.; CASTRO, C. H. de; FERREIRA, A. J.; COLLETA, H.; MELO, M. B.; ALENINA, N.; BADER, M.; OLIVEIRA, L. A.; SANTOS, R. A. S.; KITTEN, G. T. Angiotensin-(1-7) receptor Mas is an essential modulator of extracellular matrix protein expression in the heart. **Regul. Pept.**, v. 175, n. 1/3, p. 30-42, 2012.

GE, X.; HAN, Z.; CHEN, F.; WANG, H.; ZHANG, B.; JIANG, R.; LEI, P.; ZHANG, J. MiR-21 alleviates secondary blood-brain barrier damage after traumatic brain injury in rats. **Brain Res.**, v. 1603, p. 150-157, 2015.

GEMBARDT, F.; STERNER-KOCK, A.; IMBODEN, H.; SPALTEHOLZ, M.; REIBITZ, F.; SCHULTHEISS, H. P.; SIEMS, W. E.; WALTHER, T. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. **Peptides**, v. 26, n. 7, p. 1270-1277, 2005.

GIANI, J. F.; MAYER, M. A.; MUÑOZ, M. C.; SILBERMAN, E. A.; HÖCHT, C.; TAIRA, C. A.; GIRONACCI, M. M.; TURYN, D.; DOMINICI, F. P. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 296, n. 2, p. E262-E271, 2009.

GILKES, D. M.; SEMENZA, G. L.; WIRTZ, D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 14, n. 6, p. 430-439, 2014.

GLOUSHANKOVA, N. A. Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumor transformation. **Biochemistry**, v. 73, n. 7, p. 742-750, 2008.

GONZALEZ-MARISCAL, L.; TAPIA, R.; HUERTA, M.; LOPEZ-BAYGHEN, E. The tight junction protein ZO-2 blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 expression. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 1165, p. 121-125, 2009.

GORDÓN-NUÑEZ, M. A.; LOPRES, F. F.; CAVALCANTE, R. B.; SOUZA, L. B.; FREITAS, R. A.; PINTO, L. P. Moléculas de adesão e câncer oral: revisão de literatura. **R. Fac. Odontol.**, v. 48, n. 1/3, p. 53-56, 2007.

GOTTLIEB, E.; VANDER HEIDEN, M. G.; THOMPSON, C. B. Bcl-XL prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. **Mol. Cell Biol.**, v. 20, p. 5680-689, 2000.

GOTTLIEB, R. A. Mitochondrial and apoptosis. **Biol. Signals Recept.**, v. 10, p. 147-161, 2001.

GRIDELLI, C.; MAIONE, P.; ROSSI, A.; MARINIS, F. de. The role of bevacizumab in the treatment of non-small cell lung cancer: current indications and future developments. **Oncologist**, v. 12, n. 10, p. 1183-1193, 2007.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HALL, R. D.; LE, T. M.; HAGGSTROM, D. E.; GENTZLER, R. D. Angiogenesis inhibition as a therapeutic strategy in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Transl. Lung Cancer Res.**, v. 4, n. 5, p. 515-523, 2015.

HANIF, K.; BID, H. K.; KONWAR, R. Reinventing the ACE inhibitors: some old and new implications of ACE inhibition. **Hypertens. Res.**, v. 33, n. 1, p. 11-21, 2010.

HAYASHI, T.; KOYAMA, N.; AZUMA, Y.; KASHIMATA, M. Mesenchymal miR-21 regulates branching morphogenesis in murine submandibular gland in vitro. **Dev. Biol.**, v. 352, p. 299-307, 2011.

HELLNER, K.; WALTHER, T.; SCHUBERT, M.; ALBRECHT, D. Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. **Mol. Cell. Neurosci.**, v. 29, p. 427-435, 2005.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HIDALGO, M.; ECKHARDT, S. G. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 93, n. 3, p. 178-193, 2001.

HOLY, Z.; BRASZKO, J.; KUPRYSZEWSKI, G.; WITCZUK, B.; WISNIEWSKI, K. Angiotensin II-derived peptides devoid of phenylalanine in position 8 have full psychotropic activity of the parent hormone. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 43, n. 2, p. 183-192, 1992.

HOOVER, K. B.; LIAO, S. Y.; BRYANT, P. J. Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. **Am. J. Pathol.**, v. 153, n. 6, p. 1767-1773, 1998.

HUANG, Y.; YANG, Y. B.; ZHANG, X. H.; YU, X. L.; WANG, Z. B.; CHENG, X. C. MicroRNA-21 gene and câncer. **Med. Oncol.**, v. 30, n. 1, p. 376-385, 2013.

IMIELINSKI, M.; BERGER, A. H.; HAMMERMAN, P. S.; HERNANDEZ, B.; PUGH, T. J.; HODIS, E.; CHO, J.; SUH, J.; CAPELLETTI, M.; SIVACHENKO, A.; SOUGNEZ, C.; AUCLAIR, D.; LAWRENCE, M. S.; STOJANOV, P.; CIBULSKIS, K.; CHOI, K.; DE WAAL, L.; SHARIFNIA, T.; BROOKS, A.; GREULICH, H.; BANERJI, S.; ZANDER, T.; SEIDEL, D.; LEENDERS, F.; ANSÉN, S.; LUDWIG, C.; ENGEL-RIEDEL, W.; STOELBEN, E.; WOLF, J.; GOPARJU, C.; THOMPSON, K.; WINCKLER, W.; KWIATKOWSKI, D.; JOHNSON, B. E.; JÄNNE, P. A.; MILLER, V. A.; PAO, W.; TRAVIS, W. D.; PASS, H. I.; GABRIEL, S. B.; LANDER, E. S.; THOMAS, R. K.; GARRAWAY, L. A.; GETZ, G.; MEYERSON, M. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. **Cell**, v. 150, n. 6, p. 1107-1120, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Pulmão**. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao>>. Acesso em: 07 jan. 2016.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LUNG CANCER. **Patient Resources**. Aurora. Disponível em: <<https://www.iaslc.org/about-lung-cancer>>. Acesso em: 07 jan. 2016.

IWAI, M.; HORIUCHI, M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. **Hypertens. Res.**, v. 32, n. 7, p. 533-536, 2009.

JACKSON, A. L.; BARTZ, S. R.; SCHELTER, J.; KOBAYASHI, S. V.; BURCHARD, J.; MAO, M.; LI, B.; CAVET, G.; LINSLEY, P. S. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. **Nat. Biotechnol.**, v. 21, n. 6, p. 635-637, 2003.

JEANES, A.; GOTTARDI, C. J.; YAP, A. S. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? **Oncogene**, v. 27, n. 55, p. 6920-6929, 2008.

JIA, W.; LU, R.; MARTIN, T. A.; JIANG, W. G. The role of claudin-5 in blood-brain barrier (BBB) and brain metastases (Review). **Mol. Med. Rep.**, v. 9, n. 3, p. 779-785, 2014.

JIANG, F.; YANG, J.; ZHANG, Y.; DONG, M.; WANG, S.; ZHANG, Q.; LIU, F. F.; ZHANG, K.; ZHANG, C. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1-7: novel therapeutic targets. **Nat. Rev. Cardiol.**, v. 11, n. 7, p. 413-426, 2014.

JIANG, T.; GAO, L.; GUO, J.; LU, J.; WANG, Y.; ZHANG, Y. Suppressing inflammation by inhibiting NF- $\kappa$ B pathway contributes to the neuroprotection of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischemia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 167, n. 7, p. 1520-1532, 2012.

JU, Y. S.; LEE, W. C.; SHIN, J. Y.; LEE, S.; BLEAZARD, T.; WON, J. K.; KIM, Y. T.; KIM, J. I.; KANG, J. H.; SEO, J. S. A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. **Genome Res.**, v. 22, n. 3, p. 436-445, 2012.

KAIHARA, T.; KUSAKA, T.; NISHI, M.; KAWAMATA, H.; IMURA, J.; KITAJIMA, K.; ITOH-MINAMI, R.; AOYAMA, N.; KASUGA, M.; ODA, Y.; HATTORI, M.; FUJIMORI, T. Dedifferentiation and decreased expression of adhesion molecules, E-cadherin and ZO-1, in colorectal cancer are closely related to liver metastasis. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 22, n. 1, p. 117-123, 2003.

KAMIYAMA, M.; URUSHIHARA, M.; MORIKAWA, T.; KONISHI, Y.; IMANISHI, M.; NISHIYAMA, A.; KOBORI, H. Oxidative stress/angiotensinogen/renin-angiotensin system axis in patients with diabetic nephropathy. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 11, p. 23045-23062, 2013.

KAN, Z.; JAISWAL, B. S.; STINSON, J.; JANAKIRAMAN, V.; BHATT, D.; STERN, H. M.; YUE, P.; HAVERTY, P. M.; BOURGON, R.; ZHENG, J.; MOORHEAD, M.; CHAUDHURI, S.; TOMSHO, L. P.; PETERS, B. A.; PUJARA, K.; CORDES, S.; DAVIS, D. P.; CARLTON, V. E.; YUAN, W.; LI, L.; WANG, W.; EIGENBROT, C.; KAMINKER, J. S.; EBERHARD, D. A.; WARING, P.; SCHUSTER, S. C.; MODRUSAN, Z.; ZHANG, Z.; STOKOE, D.; DE SAUVAGE, F. J.; FAHAM, M.; SESHAGIRI, S. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 869-873, 2010.

KANG, T.; WEI, Y.; HONAKER, Y.; YAMAGUCHI, H.; APPELLA, E.; HUNG, M. C.; PIWNICA-WORMS, H. GSK-3 beta targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis, and GSK-3 beta inactivation correlates with Cdc25A overproduction in human cancers. **Cancer Cell**, v. 13, n. 1, p. 36-47, 2008.

KERKELA, E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. **Exp. Dermatol.**, v. 12, n. 2, p. 109-125, 2003.

KIM, D.; KIM, S.; KOH, H.; YOON, S. O.; CHUNG, A. S.; CHO, K. S.; CHUNG J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. **FASEB J.**, v. 15, n. 11, p. 1953-1962, 2001.

KIMURA, Y.; SHIOZAKI, H.; HIRAO, M.; MAENO, Y.; DOKI, Y.; INOUE, M.; MONDEN, T.; ANDO-AKATSUKA, Y.; FURUSE, M.; TSUKITA, S.; MONDEN, M. Expression of occludin, tight-junction-associated protein, in human digestive tract. **Am. J. Pathol.**, v. 151, n. 1, p. 45-54, 1997.

KOHRMANN, A.; KAMMERER, U.; KAPP, M.; DIETL, J.; ANACKER, J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: new findings and review of the literature. **BMC Cancer**, 2009. doi: 10.1186/1471-2407-9-188.

KRICHEVSKY, A. M.; GABRIELY, G. MiR-21: a small multi-faceted RNA. **J. Cell Mol. Med.**, v. 13, n. 1, p. 39-53, 2009.

KSIEZAK-REDING, H.; PYO, H. K.; FEINSTEIN, B.; PASINETTI, G. M. Akt/PKB kinase phosphorylates separately Thr212 and Ser214 of tau protein in vitro. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1639, n. 3, p. 159-168, 2003.

KUMARSWAMY, R.; VOLKMANN, I.; THUM, T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. **RNA Biology**, v. 8, n. 5, p. 706-713, 2011.

KWON, J.; LEE, S.; YANG, K.; AHN, Y.; KIM, Y. J.; STADTMAN, E. R.; RHEE, S. G. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, n. 47, p. 16419-16424, 2004.

LAMB, L. E.; ZARIF, J. C.; MIRANTI, C. K. The androgen receptor induces integrin  $\alpha 6\beta 1$  to promote prostate tumor cell survival via NF- $\kappa$ B and Bcl-xL independently of PI3K signaling. **Cancer Res.**, v. 71, n. 7, p. 2739-2745, 2011.

LAMPUGNANI, M. G.; CORADA, M.; CAVEDA, L.; BREVIARIO, F.; AYALON, O.; GEIGER, B.; DEJANA, E. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (ve-cadherin). **J. Cell Biol.**, v. 129, n. 1, p. 203-217, 1995.

LAZARONI, T. L.; RASLAN, A. C.; FONTES, W. R.; OLIVEIRA, M. L. de; BADER, M.; ALENINA, N.; MORAES, M. F.; SANTOS, R. A. dos; PEREIRA, G. S. Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 97, n. 1, p. 113-123, 2012.

LE CHEVALIER, T.; SCAGLIOTTI, G.; NATALE, R.; DANSON, S.; ROSELL, R.; STAHEL, R.; THOMAS, P.; RUDD, R. M.; VANSTEENKISTE, J.; THATCHER, N.; MANEGOLD, C.; PUJOL, J. L.; VAN ZANDWIJK, N.; GRIDELLI, C.; VAN MEERBEECK, J. P.; CRINO, L.; BROWN, A.; FITZGERALD, P.; ARISTIDES, M.; SCHILLER, J. H. Efficacy of gemcitabine plus platinum chemotherapy compared with other platinum containing regimens in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of survival outcomes. **Lung Cancer**, v. 47, n. 1, p. 69-80, 2005.

LEE, C. G.; McCARTHY, S.; GRUIDL, M.; TIMME, C.; YEATMAN, T. J. MicroRNA-147 induces a mesenchymal-to-epithelial transition (MET) and reverses EGFR inhibitor resistance. **PLoS One**, v. 9, n. 1, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0084597.

LEE, S. O.; JEONG, Y. J.; IM, H. G.; KIM, C. H.; CHANG, Y. C.; LEE, I. S. Silibinin suppresses PMA-induced MMP-9 expression by blocking the AP-1 activation via MAPK signaling pathways in MCF-7 human breast carcinoma cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 354, n. 1, p. 165-171, 2007.

LEE, Y. S.; WURSTER, R. D. Effects of antioxidants on the anti-proliferation induced by protein synthesis inhibitors in human brain tumor cells. **Cancer Lett.**, v. 93, n. 2, p. 157-163, 1995.

LELAND, D. S.; GINOCCHIO, C. C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 1, p. 49-78, 2007.

- LI, D.; MRSNY, R. J. Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via downregulation of occludin. **J. Cell Biol.**, v. 148, p. 791-800, 2000.
- LI, S.; LIANG, Z.; XU, L.; ZOU, F. MicroRNA-21: a ubiquitously expressed pro-survival factor in cancer and other diseases. **Mol. Cell Biochem.**, v. 360, p. 147-158, 2012.
- LI, Y.; ZHU, X.; GU, J., HU, H.; DONG, D.; YAO, J.; LIN, C.; FEI, J. Anti-miR-21 oligonucleotide enhances chemosensitivity of leukemic HL60 cells to arabinosylcytosine by inducing apoptosis. **Hematology**, v. 15, n. 4, p. 215-221, 2010.
- LIMA, R. T.; BUSACCA, S.; ALMEIDA, G. M.; GAUDINO, G.; FENNELL, D. A.; VASCONCELOS, M. H. MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 47, n. 2, p. 163-174, 2011.
- LINDENBACH, B. D.; EVANS, M. J.; SYDER, A. J.; WÖLK, B.; TELLINGHUISEN, T. L.; LIU, C. C.; RICE, C. M. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. **Science**, v. 309, n. 5734, p. 623-626, 2005.
- LITVINOV, S. V.; BAKKER, H. A.; GOUREVITCH, M. M.; VELDERS, M. P.; WARNAAR, S. O. Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. **Cell Adhes. Commun.**, v. 2, n. 5, p. 417-428, 1994.
- LOFFLER, D.; BROCKE-HEIDRICH, K.; PFEIFER, G.; STOCSITS, C.; HACKERMULLER, J.; KRETZSCHMAR, A. K.; BURGER, R.; GRAMATZKI, M.; BLUMERT, C.; BAUER, K.; CVIJIC, H.; ULLMANN, A. K.; STADLER, P. F.; HORN, F. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1330-1333, 2007.
- LOPEZ-BERGAMI, P.; HUANG, C.; GOYDOS, J. S.; YIP, D.; BAR-ELI, M.; HERLYN, M.; SMALLEY, K. S.; MAHALE, A.; EROSHKIN, A.; AARONSON, S.; RONAI, Z. Rewired ERK-JNK signaling pathways in melanoma. **Cancer Cell**, v. 11, p. 447-460, 2007.
- LUBEL, J. S.; HERATH, C. B.; TCHONGUE, J.; GRACE, J.; JIA, Z.; SPENCER, K.; CASLEY, D.; CROWLEY, P.; SIEVERT, W.; BURRELL, L. M.; ANGUS, P. W. 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 rat. **Clin. Sci.**, v. 117, p. 375-386, 2009.
- LYNCH, T. J.; BELL, D. W.; SORDELLA, R.; GURUBHAGAVATULA, S.; OKIMOTO, R. A.; BRANNIGAN, B. W.; HARRIS, P. L.; HASERLAT, S. M.; SUPKO, J. G.; HALUSKA, F. G.; LOUIS, D. N.; CHRISTIANI, D. C.; SETTLEMAN J.; HABER, D. A. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 21, p. 2129-2139, 2004.
- MACHADO, R. D.; SANTOS, R. A.; ANDRADE, S. P. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. **Life Sci.**, v. 66, n. 1, p. 67-76, 2000.

MAETZEL, D.; DENZEL, S.; MACK, B.; CANIS, M.; WENT, P.; BENK, M.; KIEU, C.; PAPIOR, P.; BAEUERLE, P. A.; MUNZ, M.; GIRES, O. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. **Nat. Cell Biol.**, v. 11, n. 2, p. 162-171, 2009.

MANSFIELD, C. M.; KIMLER, B. F.; HENDERSON, S. D.; VATS, T. S.; SVOBODA, D. J. Angiotensin-I-converting enzyme in cancer patients. **J. Clin. Oncol.**, v. 2, n. 5, p. 452-456, 1984.

MARCUS, Y.; SHEFER, G.; SASSON, K.; KOHEN, F.; LIMOR, R.; PAPPO, O.; NEVO, N.; BITON, I.; BACH, M.; BERKUTZKI, T.; FRIDKIN, M.; BENAYAHU, D.; SHECHTER, Y.; STERN, N. Angiotensin 1–7 as means to prevent the metabolic syndrome: lessons from the fructose-fed rat model. **Diabetes**, v. 62, n. 4, p. 1121-1130, 2013.

MARKOU, A.; TSAROUCOA, E. G.; KAKLAMANIS, L.; FOTINO, M.; GEORGOULIAS, V.; LIANIDOU, E. S. Prognostic value of mature microRNA- 21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. **Clin. Chem.**, v. 54, n. 10, p. 1696-1704, 2008.

MARTIN, T. A.; MANSEL, R. E.; JIANG, W. G. Antagonistic effect of NK4 on HGF/SF induced changes in the transendothelial resistance (TER) and paracellular permeability of human vascular endothelial cells. **J. Cell Physiol.**, v. 192, n. 3, p. 268-275, 2002.

MARTOWICZ, A.; RAINER, J.; LELONG, J.; SPIZZO, G.; GASTL, G.; UNTERGASSER, G. EpCAM overexpression prolongs proliferative capacity of primary human breast epithelial cells and supports hyperplastic growth. **Mol. Cancer**, 2013. doi: 10.1186/1476-4598-12-56.

MATOBA, S.; KANG, J. G.; PATINO, W. D.; WRAGG, A.; BOEHM, M.; GAVRILOVA, O.; HURLEY, P. J.; BUNZ, F.; HWANG, P. M. p53 regulates mitochondrial respiration. **Science**, v. 312, n. 5780, p. 1650-1653, 2006.

MATSUI, T.; ROSENZWEIG, A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 38, n. 1, p. 63-71, 2005.

McCOLLUM, L. T.; GALLAGHER, P. E.; TALLANT, E. A. Angiotensin-(1-7) abrogates mitogen-stimulated proliferation of cardiac fibroblasts. **Peptides**, v. 34, n. 2, p. 380-388, 2012.

McCUBREY, J. A.; STEELMAN, L. S.; CHAPPELL, W. H.; ABRAMS, S. L.; MONTALTO, G.; CERVELLO, M.; NICOLETTI, F.; FAGONE, P.; MALAPONTE, G.; MAZZARINO, M. C.; CANDIDO, S.; LIBRA, M.; BÄSECKE, J.; MIJATOVIC, S.; MAKSIMOVIC-IVANIC, D.; MILELLA, M.; TAFURI, A.; COCCO, L.; EVANGELISTI, C.; CHIARINI, F.; MARTELLI, A. M. Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. **Oncotarget**, v. 3, n. 9, p. 954-987, 2012.

McNEIL, E.; CAPALDO, C. T.; MACARA, I. G. Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. **Mol. Biol. Cell**, v. 17, n. 4, p. 1922-1932, 2006.

MELKAMU, T.; ZHANG, X.; TAN, J.; ZENG, Y.; KASSIE, F. Alteration of microRNA expression in vinyl carbamate-induced mouse lung tumors and modulation by the chemopreventive agent indole-3-carbinol. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 2, p. 252-258, 2010.

MENON, J.; SOTO-PANTOJA, D. R.; CALLAHAN, M. F.; CLINE, J. M.; FERRARIO, C. M.; TALLANT, E. A.; GALLAGHER, P. E. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice through a reduction in cyclooxygenase-2. **Cancer Res.**, v. 67, n. 6, p. 2809-2815, 2007.

MELLO, W. C. de; FROHLICH, E. D. Clinical perspectives and fundamental aspects of local cardiovascular and renal renin-angiotensin systems. **Front. Endocrinol.**, 2014. doi: 10.3389/fendo.2014.00016.

METZGER, R.; BADER, M.; LUDWIG, T.; BERBERICH, C.; BUNNEMANN, B.; GANTEN, D. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. **FEBS Lett.**, v. 357, n. 1, p. 27-32, 1995.

MISHRA, R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. **Mol. Cancer**, 2010. doi: 10.1186/1476-4598-9-144.

MITTARI, E.; CHARALABOPOULOS, A.; BATISTATOU, A.; CHARALABOPOULOS, K. The role of e-cadherin/catenin complex in laryngeal cancer. **Exp. Oncol.**, v. 27, n. 4, p. 257-261, 2005.

MOCANU, M. M.; YELLON, D. M. PTEN, the Achilles heel of myocardial ischaemia/reperfusion injury? **Br. J. Pharmacol.**, v. 150, n. 7, p. 833-838, 2007.

MOORE, L. M.; ZHANG, W. Targeting miR-21 in glioma: a small RNA with big potential. **Expert Opin. Ther. Targets**, v. 14, n. 11, p. 1247-1257, 2010.

MUÑOZ, J. M.; BRAUN-MENENDEZ, E.; FASCIOLO, J. D.; LELOIR, L. F. Hypertensin: the substance causing renal hypertension. **Nature**, v. 144, p. 980, 1939.

MUÑOZ, M. C.; GIANI, J. F.; DOMINICI, F. P. Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of Akt in rat extracardiac tissues in vivo via receptor Mas. **Regul. Pept.**, v. 161, n. 1/3, p. 1-7, 2010.

NABESHIMA, K.; INOUE, T.; SHIMAO, Y.; SAMESHIMA, T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathol. Int.**, v. 52, n. 4, p. 255-264, 2002.

NI, L.; FENG, Y.; WAN, H.; MA, Q.; FAN, L.; QIAN, Y.; LI, Q.; XIANG, Y.; GAO, B. Angiotensin-(1-7) inhibits the migration and invasion of A549 human lung adenocarcinoma cells through inactivation of the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. **Oncol. Rep.**, v. 27, n. 3, p. 783-790, 2012.

- NI, S.; XU, L.; HUANG, J.; FENG, J.; ZHU, H.; WANG, G.; WANG, X. Increased ZO-1 expression predicts valuable prognosis in non-small cell lung cancer. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 6, n. 12, p. 2887-2895, 2013.
- NIESSEN, C. M.; GOTTARDI, C. J. Molecular components of the adherens junction. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1778, n. 3, p. 562-571, 2008.
- OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592-603, 2004.
- OSAKI, M.; OSHIMURA, M.; ITO, H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, n. 6, p. 667-676, 2004.
- OSANAI, M.; MURATA, M.; NISHIKIORI, N.; CHIBA, H.; KOJIMA, T.; SAWADA, N.; 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, n. 18, p. 9125-9133, 2006.
- OSTERREICHER, C. H.; TAURA, K.; DE MINICIS, S.; SEKI, E.; PENZ-OSTERREICHER, M.; KODAMA, Y.; KLUWE, J.; SCHUSTER, M.; OUDIT, G. Y.; PENNINGER, J. M.; BRENNER, D. A. Angiotensin-converting-enzyme 2 inhibits liver fibrosis in mice. **Hepatology**, v. 50, n. 3, p. 929-938, 2009.
- OUDIT, G. Y.; KASSIRI, Z.; ZHOU, J.; LIU, Q. C.; LIU, P. P.; BACKX, P. H.; DAWOOD, F.; CRACKOWER, M. A.; SCHOLEY, J. W.; PENNINGER, J. M. Loss of PTEN attenuates the development of pathological hypertrophy and heart failure in response to biomechanical stress. **Cardiovasc. Res.**, v. 78, n. 3, p. 505-514, 2008.
- PAEZ, J. G.; JÄNNE, P. A.; LEE, J. C.; TRACY, S.; GREULICH, H.; GABRIEL, S.; HERMAN, P.; KAYE, F. J.; LINDEMAN, N.; BOGGON, T. J.; NAOKI, K.; SASAKI, H.; FUJII, Y.; ECK, M. J.; SELLERS, W. R.; JOHNSON, B. E.; MEYERSON, M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. **Science**, v. 304, n. 5676, p. 1497-1500, 2004.
- PAGE, I. H.; HELMER, O. M. Angiotensin-activator, renin- and angiotensin-inhibitor, and the mechanism of angiotensin-tachyphylaxis in normal, hypertensive, and nephrectomized animals. **J. Exp. Med.**, v. 71, n. 4, p. 495-519, 1940.
- PAL, S. K.; FIGLIN, R. A.; RECKAMP, K. L. The role of targeting mammalian target of rapamycin in lung cancer. **Clin. Lung Cancer**, v. 9, n. 6, p. 340-345, 2008.
- PAN, C. H.; WEN, C. H.; LIN, C. S. Interplay of angiotensin II and angiotensin-(1-7) in the regulation of matrix metalloproteinases of human cardiocytes. **Exp. Physiol.**, v. 93, n. 5, p. 599-612, 2009.
- PARKS, W. C.; SHAPIRO, S. D. Matrix metalloproteinases in lung biology. **Respir. Res.**, v. 2, n. 1, p. 10-19, 2001.
- PASSOS-SILVA, D. G.; VERANO-BRAGA, T.; SANTOS, R. A. S. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. **Clin. Sci.**, v. 124, n. 7, p. 443-456, 2013.

- PEI, S.; YANG, X.; WANG, H.; ZHANG, H.; ZHOU, B.; ZHANG, D.; LIN, D. Plantamajoside, a potential anti-tumor herbal medicine inhibits breast cancer growth and pulmonary metastasis by decreasing the activity of matrix metalloproteinase-9 and -2. **BMC Cancer**, 2015. doi: 10.1186/s12885-015-1960-z.
- PENDERGRASS, K. D.; AVERILL, D. B.; FERRARIO, C. M.; DIZ, D. I.; CHAPPELL, M. C. Differential expression of nuclear AT1 receptors and angiotensin II within the kidney of the male congenic mRen2.Lewis rat. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.**, v. 290, n. 6, p. F1497-F1506, 2006.
- PEREIRA, R. M.; SANTOS, R. A. dos; TEIXEIRA, M. M.; LEITE, V. H.; COSTA, L. P.; DIAS, F. L. da C.; BARCELOS, L. S.; COLLARES, G. B.; SILVA, A. C. S. e. The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: evidence for a protective role of angiotensin-(1-7). **J. Hepatol.**, v. 46, n. 4, p. 674-681, 2007.
- PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1644, n. 2/3, p. 83-94, 2004.
- PHILLIPS, B. E.; CANCEL, L.; TARBELL, J. M.; ANTONETTI, D. A. Occludin independently regulates permeability under hydrostatic pressure and cell division in retinal pigment epithelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 49, n. 6, p. 2568-2576, 2008.
- PINHEIRO, S. V.; SIMÕES e SILVA, A. C.; SAMPAIO, W. O.; PAULA, R. D. de; MENDES, E. P.; BONTEMPO, E. D.; PESQUERO, J. B.; WALTHER, T.; ALENINA, N.; BADER, M.; BLEICH, M.; SANTOS, R. A. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. **Hypertension**, v. 44, n. 4, p. 490-496, 2004.
- PONCE, D. P.; MATURANA, J. L.; CABELLO, P.; YEFI, R.; NIECHI, I.; SILVA, E.; ARMISEN, R.; GALINDO, M.; ANTONELLI, M.; TAPIA, J. C. Phosphorylation of AKT/PKB by CK2 is necessary for the AKT dependent up-regulation of  $\beta$ -catenin transcriptional activity. **J. Cell Physiol.**, v. 226, n. 7, p. 1953-1959, 2011.
- PRINGLE, K. G.; TADROS, M. A.; CALLISTER, R. J.; LUMBERS, E. R. The expression and localization of the human placental prorenin/renin-angiotensin system throughout pregnancy: roles in trophoblast invasion and angiogenesis? **Placenta**, v. 32, n. 12, p. 956-962, 2011.
- RAMACHANDRA, R. K.; SALEM, M.; GAHR, S.; REXROAD, C. E.; YAO, J. Cloning and characterization of microRNAs from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): their expression during early embryonic development. **BMC Dev. Biol.**, 2008. doi: 10.1186/1471-213X-8-41.
- REDDY, K. B.; NABHA, S. M.; ATANASKOVA, N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 22, n. 4, p. 395-403, 2003.

REIS, F. M.; BOUISSOU, D. R.; PEREIRA, V. M.; CAMARGOS, A. F.; REIS, A. M. dos; SANTOS, R. A. Angiotensin-(1–7), its receptor Mas and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. **Fertil. Steril.**, v. 95, n. 1, p. 176-181, 2011.

RIGATTO, K. V.; BÖHLKE, M.; IRIGOYEN, M. C. Sistema renina angiotensina: da fisiologia ao tratamento. **Rev. Soc. Cardiol. Rio Grande do Sul**, v. 13, n. 3, p. 1-5, 2004.

RODGERS, L. S.; BEAM, M. T.; ANDERSON, J. M.; FANNING, A. S. Epithelial barrier assembly requires coordinated activity of multiple domains of the tight junction protein ZO-1. **J. Cell Sci.**, v. 126, pt 7, p. 1565-1575, 2013.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, C. O.; TORRES-GARCÍA, S. E.; OLVERA-SANDOVAL, C.; RAMÍREZ-CASTILLO, F. Y.; MURO, A. L.; AVELAR-GONZALEZ, F. J.; GUERRERO-BARRERA, A. L. Cell culture: history, development and prospects. **Int. J. Curr. Res. Aca. Rev.**, v. 2, n. 12, p. 188-200, 2014.

ROLFF, J.; BECKER, M.; MERK, J.; HOFFMANN, J.; FICHTNER, I. Preclinical study of a combination of erlotinib and bevacizumab in early stages of unselected non-small cell lung cancer patient-derived xenografts. **Targ. Oncol.**, 2016.  
doi: 10.1007/s11523-015-0415-4

ROMER, F. K. Angiotensin-converting enzyme and its association with outcome in lung cancer. **Br. J. Cancer**, v. 43, n. 2, p. 135-142, 1981.

ROSENTHAL, T.; GAVRAS, I. Angiotensin inhibition and malignancies: a review. **J. Hum. Hypertens.**, v. 23, n. 10, p. 623-635, 2009.

ROULSTON, J. E.; GALLOWAY, P. J.; DOUGLAS, G. Plasma angiotensin-converting enzyme activity in patients with bronchial carcinoma. **Br. J. Dis. Chest.**, v. 80, n. 3, p. 229-234, 1986.

RUNKLE, E. A.; MU, D. Tight junction proteins: from barrier to tumorigenesis. **Cancer Lett.**, v. 337, n. 1, p. 41-48, 2013.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biol. Chem.**, v. 385, n. 6, p. 449-464, 2004.

RUSSO, A.; FRANCHINA, T.; ROSARIA, G.; RICCIARDI, R.; PICONE, A.; FERRARO, G.; ZANGHÌ, M.; TOSCANO, G.; GIORDANO, A.; ADAMO, V. A decade of EGFR inhibition in EGFR-mutated non small cell lung cancer (NSCLC): old successes and future perspectives. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 26814-26825, 2015.

RUZZENE, M.; PINNA, L. A. Addiction to protein kinase CK2: a common denominator of diverse cancer cells? **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1804, n. 3, p. 499-504, 2010.

RUZZO, A.; GRAZIANO, F.; VINCENZI, B.; CANESTRARI, E.; PERRONE, G.; GALLUCCIO, N.; CATALANO, V.; LOUPAKIS, F.; RABITTI, C.; SANTINI, D.; TONINI, G.; FIORENTINI, G.; ROSSI, D.; FALCONE, A.; MAGNANI, M. High let-7a microRNA levels in KRAS-mutated colorectal carcinomas may rescue anti-EGFR therapy effects in patients with chemotherapy-refractory metastatic disease. **Oncologist**, v. 17, n. 6, p. 823-829, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2222 p.

SAMPAIO, W. O.; CASTRO, C. H. de; SANTOS, R. A.; SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. **Hypertension**, v. 50, n. 6, p. 1093-1098, 2007a.

SAMPAIO, W. O.; SANTOS, R. A. S. dos; FARIA-SILVA, R.; MACHADO, L. T. da M.; SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 185-192, 2007b.

SÁNCHEZ-PULIDO, L.; MARTÍN-BELMONTE, F.; VALENCIA, A.; ALONSO, M. A. MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. **Trends Biochem. Sci.**, v. 27, n. 12, p. 599-601, 2002.

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; SIMÕES e SILVA, A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas axis. **Exp. Physiol.**, v. 93, n. 5, p. 519-527, 2008.

SANTOS, R. A. S.; SIMÕES e SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; BUHR, I. de; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 14, p. 8258-8263, 2003.

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; PINHEIRO, S. V.; SAMPAIO, W. O.; TOUYZ, R.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 14, n. 8, p. 019-1031, 2005.

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; VERANO-BRAGA, T.; BADER, M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. **J. Endocrinol.**, v. 216, n. 2, p. R1-R17, 2013.

SANTOS, S. H.; BRAGA, J. F.; MARIO, E. G.; PORTO, L. C.; RODRIGUES-MACHADO, M. G.; MURARI, A.; BOTION, L. M.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R. A. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 30, n. 5, p. 953-961, 2010.

SANTOS, S. H.; GIANI, J. F.; BURGHI, V.; MIQUET, J. G.; QADRI, F.; BRAGA, J. F.; TODIRAS, M.; KOTNIK, K.; ALENINA, N.; DOMINICI, F. P.; SANTOS, R. A.; BADER, M. Oral administration of angiotensin-(1–7) ameliorates type 2 diabetes in rats. **J. Mol. Med.**, v. 92, n. 3, p. 255-265, 2014.

SCHULZKE, J. D.; GITTER, A. H.; MANKERTZ, J.; SPIEGEL, S.; SEIDLER, U.; AMASHEH, S.; SAITOU, M.; TSUKITA, S.; FROMM, M. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1669, n. 1, p. 34-42, 2005.

SCHWEISFURTH, H.; HEINRICH, J.; BRUGGER, E.; STEINL, C.; MAIWALD, L. The value of angiotensin-I-converting enzyme determinations in malignant and other diseases. **Clin. Physiol. Biochem.**, v. 3, n. 4, p. 184-192, 1985.

SELCUKLU, S. D.; DONOGHUE, M. T.; SPILLANE, C. MiR-21 as a key regulator of oncogenic processes. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 37, n. 4, p. 918-925, 2009.

SHI, G. H.; YE, D. W.; YAO, X. D.; ZHANG, S. L.; DAI, B.; ZHANG, H. L.; SHEN, Y. J.; ZHU, Y.; ZHU, Y. P.; XIAO, W. J.; MA, C. G. Involvement of microRNA-21 in mediating chemo-resistance to docetaxel in androgen-independent prostate cancer PC3 cells. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 31, n. 7, p. 867-873, 2010.

SHI, L.; CHEN, J.; YANG, J.; PAN, T.; ZHANG, S.; WANG, Z. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/ Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. **Brain Res.**, v. 1352, p. 255-264, 2010.

SHIPP, M. A.; TARR, G. E.; CHEN, C. Y.; SWITZER, S. N.; HERSH, L. B.; STEIN H.; SUNDAY, M. E.; REINHERZ, E. L. CD10/Neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 88, n. 23, p. 10662-10666, 1991.

SHTIVELMAN, E.; HENSING, T.; SIMON, G. R.; DENNIS, P. A.; OTTERSON, G. A.; BUENO, R.; SALGIA, R. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 6, p. 1392-1433, 2014.

SIEFKIN, A. D.; PARSONS, G. H.; PATWELL, S. W.; HOLLINGER, M. A. The value of serial serum angiotensin converting enzyme determinations in hospitalized patients with lung disease. **Am. J. Med. Sci.**, v. 288, n. 5, p. 200-207, 1984.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA Cancer J. Clin.**, v. 63, n. 1, p. 11-30, 2013.

SIMON, M.; ARGIRIS, A.; MURREN, J. R.; Progress in the therapy of small cell lung cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 49, n. 2, p. 119-133, 2004.

SIMPSON, L.; PARSONS, R. PTEN: life as a tumor suppressor. **Exp. Cell Res.**, v. 264, n. 1, p. 29-41, 2001.

SONG, B.; WANG, Y.; KUDO, K.; GAVIN, E. J.; XI, Y.; JU, J. MiR-192 regulates dihydrofolate reductase and cellular proliferation through the p53-microRNA circuit. **Clin. Cancer Res.**, v. 14, n. 24, p. 8080-8086, 2008.

SONVEAUX, P.; VEGRAN, F.; SCHROEDER, T.; WERGIN, M. C.; VERRAX, J.; RABBANI, Z. N.; DE SAEDELEER, C. J.; KENNEDY, K. M.; DIEPART, C.; JORDAN, B. F.; KELLEY, M. J.; GALLEZ, B.; WAHL, M. L.; FERON, O.; DEWHIRST, M. W. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 12, p. 3930-3942, 2008.

SORIA, J. C.; LEE, H. Y.; LEE, J. I.; WANG, L.; ISSA, J. P.; KEMP, B. L.; LIU, D. D.; KURIE, J. M.; MAO, L.; KHURI, F. R. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, n. 5, p. 1178-1184, 2002.

SOTO-PANTOJA, D. R.; MENON, J.; GALLAGHER, P. E.; TALLANT, E. A. Angiotensin-(1-7) inhibits tumor angiogenesis in human lung cancer xenografts with a reduction in vascular endothelial growth factor. **Mol. Cancer Ther.**, v. 8, n. 6, p. 1676-1683, 2009.

SOUZA, W. F. **Perda de adesão célula-célula mediada pela e-caderina em câncer colo-retal: vias de sinalização envolvidas.** 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia) - Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2009.

STEELMAN, L. S.; CHAPPELL, W. H.; ABRAMS, S. L.; KEMPF, R. C.; LONG, J.; LAIDLER, P.; MIJATOVIC, S.; MAKSIMOVIC-IVANIC, D.; STIVALA, F.; MAZZARINO, M. C.; DONIA, M.; FAGONE, P.; MALAPONTE, G.; NICOLETTI, F.; LIBRA, M.; MILELLA, M.; TAFURI, A.; BONATI, A.; BÄSECKE, J.; COCCO, L.; EVANGELISTI, C.; MARTELLI, A. M.; MONTALTO, G.; CERVELLO, M.; MCCUBREY, J. A. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. **Aging**, v. 3, n. 3, p. 192-222, 2011.

ST-GERMAIN, M. E.; GAGNON, V.; MATHIEU, I.; PARENT, S.; ASSELIN, E. Akt regulates COX2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. **Intern. Journ. Oncology**, v. 24, n. 5, p. 1311-1324, 2004.

STRAATMAN, K. **Wound healing assay.** Leicesteeer. 2008. Disponível em: <[www.le.ac.uk/biochem/microscopy/pdf/Wound%20healing%20assay.pdf](http://www.le.ac.uk/biochem/microscopy/pdf/Wound%20healing%20assay.pdf)>. Acesso em: 03 mar. 2015.

SU, Z.; ZIMPELMANN, J.; BURNS, K. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells. **Kidney Int.**, v. 69, n. 12, p. 2212-2218, 2006.

SUZUKI, A.; NAKANO, T.; MAK, T. W.; SASAKI, T. Portrait of PTEN: messages from mutant mice. **Cancer Sci.**, v. 99, n. 2, p. 209-213, 2008.

TAKEDA, M.; YAMAMOTO, K.; TAKEMURA, Y.; TAKESHITA, H.; HONGYO, K.; KAWAI, T.; HANASAKI-YAMAMOTO, H.; OGURO, R.; TAKAMI, Y.; TATARA, Y.; TAKEYA, Y.; SUGIMOTO, K.; KAMIDE, K.; OHISHI, M.; RAKUGI, H. Loss of ACE2 exaggerates high-calorie diet-induced insulin resistance by reduction of GLUT4 in mice. **Diabetes**, v. 62, n. 1, p. 223-233, 2013.

TALLANT, E. A.; FERRARIO, C. M.; 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, n. 4, p. H1560-H1566, 2005.

TANG, J. M.; HE, Q. Y.; GUO, R. X.; CHANG, X. J. Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in nonsmall cell lung cancer confers poor prognosis. **Lung Cancer**, v. 51, n. 2, p. 181-191, 2006.

TAPIA, R.; HUERTA, M.; ISLAS, S.; AVILA-FLORES, A.; LOPEZ-BAYGHEN, E.; WEISKE, J.; HUBER, O.; GONZALEZ-MARISCAL, L. Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle. **Mol. Biol. Cell**, v. 20, n. 3, p. 1102-1117, 2009.

TESTA, J. R.; BELLACOSA, A. Akt plays a central role in tumorigenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, n. 20, p. 10983-10985, 2001.

TESTONI, E.; STEPHENSON, N. L.; TORRES-AYUSO, P.; MARUSIAK, A. A.; TROTTER, E. W.; HUDSON, A.; HODGKINSON, C. L.; MORROW, C. J.; DIVE, C.; BROGNARD, J. Somatically mutated ABL1 is an actionable and essential NSCLC survival gene. **EMBO Mol. Med.**, v. 8, n. 2, p. 105-116, 2016.

THAN, A.; LEOW, M. K.; CHEN, P. Control of adipogenesis by the autocrine interplays between angiotensin 1–7/Mas receptor and angiotensin II/AT1 receptor signaling pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 288, n. 22, p. 15520-15531, 2013.

THOMAS, P.; KHOKHA, R. Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in non-small cell lung cancer. **J. Pathol.**, v. 190, n. 2, p. 150-156, 2000.

TIBSHIRANI, R.; HASTIE, T.; NARASIMHAN, B.; CHU, G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, n. 10, p. 6567-6572, 2002.

TIGERSTEDT, R.; BERGMAN, P. Niere und kreislauf. **Skand. Arch. Physiol.**, v. 8, n. 1, p. 223-227, 1898.

TIPNIS, S.; HOOPER, N. M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A. J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captoprilinsensitive carboxypeptidase. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 43, p. 33238-33243, 2000.

TOH, C. K.; GAO, F.; LIM, W. T.; LEONG, S. S.; FONG, K. W.; YAP, S. P.; HSU, A. A.; ENG, P.; KOONG, H. N.; THIRUGNANAM, A.; TAN, E. H. Never-smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, n. 15, p. 2245-2251, 2006.

TOMINAGA, E.; YUASA, K.; SHIMAZAKI, S.; HIJIKATA, T. MicroRNA-1 targets Slug and endows lung cancer A549 cells with epithelial and anti-tumorigenic properties. **Exp. Cell Res.**, v. 319, n. 3, p. 77-88, 2013.

TORRES-FLORES, J. M.; ARIAS, C. F. Tight junctions go viral! **Viruses**, v. 7, n. 9, p. 5145-5154, 2015.

TOYOOKA, S.; MITSUDOMI, T.; SOH, J.; AOKAGE, K.; YAMANE, M.; OTO, T.; KIURA, K.; MIYOSHI, S. Molecular oncology of lung cancer. **Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 59, n. 8, p. 527-537, 2011.

TROTMAN, L. C.; WANG, X.; ALIMONTI, A.; CHEN, Z.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; YANG, H.; PAVLETICH, N. P.; CARVER, B. S.; CORDON-CARDO, C.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; CHI, S. G.; KIM, H. J.; MISTELI, T.; JIANG, X.; PANDOLFI, P. P. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. **Cell**, v. 128, n. 1, p. 141-156, 2007.

UEDA, S.; MASUMORI-MAEMOTO, S.; ASHINO, K.; NAGAHARA, T.; GOTOH, E.; UMEMURA, S.; ISHII, M. Angiotensin-(1-7) attenuates vasoconstriction evoked by angiotensin II but not by noradrenaline in man. **Hypertension**, v. 35, n. 4, p. 998-1001, 2000.

UMEDA, K.; MATSUI, T.; NAKAYAMA, M.; FURUSE, K.; SASAKI, H.; FURUSE, M.; TSUKITA, S. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 43, p. 44785-44794, 2004.

VALENTINO, L.; PIERRE, J. JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. **Biochem. Pharmacol.**, v. 71, n. 6, p. 713-721, 2006.

VAN DER GUN, B. T.; MELCHERS, L. J.; RUITERS, M. H.; DE LEIJ, L. F.; McLAUGHLIN, P. M.; ROTS, M. G. EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 11, p. 1913-1921, 2010.

VARELA, A. S.; BOSCO LOPEZ SAEZ, J. J. Utility of serum activity of angiotensin converting enzyme as a tumor marker. **Oncology**, v. 50, n. 6, p. 430-435, 1993.

VARGHESE, A. M.; ZAKOWSKI, M. F.; YU, H. A.; WON, H. H.; RIELY, G. J.; KRUG, L. M.; KRIS, M. G.; REKHTMAN, N.; LADANYI, M.; WANG, L.; BERGER, M. F.; PIETANZA, M. C. Small-cell lung cancers in patients who never smoked cigarettes. **J. Thorac. Oncol.**, v. 9, n. 6, p. 892-896, 2014.

- VAZ-SILVA, J.; CARNEIRO, M. M.; FERREIRA, M. C.; PINHEIRO, S. V.; SILVA, D. A.; SILVA-FILHO, A. L.; WITZ, C. A.; REIS, A. M.; SANTOS, R. A.; REIS, F. M. The vasoactive peptide angiotensin-(1-7), its receptor Mas and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human endometrium. **Reprod. Sci.**, v. 16, n. 3, p. 247-256, 2009.
- VERANO-BRAGA, T.; SCHWÄMMLE, V.; SYLVESTER, M.; PASSOS-SILVA, D. G.; PELUSO, A. A.; ETELVINO, G. M.; SANTOS, R. A.; ROEPSTORFF, P. Time-resolved quantitative phosphoproteomics: new insights into Angiotensin-(1-7) signaling networks in human endothelial cells. **J. Proteome Res.**, v. 11, n. 6, p. 3370-3381, 2012.
- VINCENT, E. E.; ELDER, D. J.; O'FLAHERTY, L.; PARDO, O. E.; DZIEN, P.; PHILLIPS, L.; MORGAN, C.; PAWADE, J.; MAY, M. T.; SOHAIL, M.; HETZEL, M. R.; SECKL, M. J.; TAVARÉ, J. M. Glycogen synthase kinase 3 protein kinase activity is frequently elevated in human non-small cell lung carcinoma and supports tumour cell proliferation. **PLoS One**, v. 9, n. 12, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0114725.
- VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 7, p. 489-501, 2002.
- WAKELEE, H. A.; CHANG, E. T.; GOMEZ, S. L.; KEEGAN, T. H.; FESKANICH, D.; CLARKE, C. A.; HOLMBERG, L.; YONG, L. C.; KOLONEL, L. N.; GOULD, M. K.; WEST, D. W. Lung cancer incidence in never smokers. **J. Clin. Oncol.**, v. 25, n. 5, p. 472-478, 2007.
- WALKER, A. E.; ROBINS, M.; WEINFELD, F. D. Epidemiology of brain tumors: the national survey of intracranial neoplasms. **Neurology**, v. 35, n. 2, p. 219-226, 1985.
- WANG, K.; HU, X.; DU, C.; TU, S.; ZHANG, F.; XIE, X. Angiotensin-(1-7) suppresses the number and function of the circulating fibrocytes by upregulating endothelial nitric oxide synthase expression. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 365, n. 1/2, p. 19-27, 2012.
- WANG, L. G.; NI, Y.; SU, B. H.; MU, X. R.; SHEN, H. C.; DU, J. J. MicroRNA-34b functions as a tumor suppressor and acts as a nodal point in the feedback loop with Met. **Int. J. Oncol.**, v. 42, n. 3, p. 957-962, 2013.
- WANG, Z.; WADE, P.; MANDELL, K. J.; AKYILDIZ, A.; PARKOS, C. A.; MRSNY, R. J.; NUSRAT, A. Raf 1 represses expression of the tight junction protein occludin via activation of the zinc-finger transcription factor slug. **Oncogene**, v. 26, n. 8, p. 1222-1230, 2007.
- WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-314, 1956.
- WEI, J.; GAO, W.; ZHU, C. J.; LIU, Y. Q.; MEI, Z.; CHENG, T.; SHU, Y. Q. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. **Chin. J. Cancer**, v. 30, n. 6, p. 407-414, 2011.

WENT, P. T.; LUGLI, A.; MEIER, S.; BUNDI, M.; MIRLACHER, M.; SAUTER, G.; DIRNHOFER, S. Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas. **Hum. Pathol.**, v. 35, n. 1, p. 122-128, 2004.

WHITAKER-MENEZES, D.; MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E.; LIN, Z.; ERTEL, A.; FLOMENBERG, N.; WITKIEWICZ, A. K.; BIRBE, R. C.; HOWELL, A.; PAVLIDES, S.; GANDARA, R.; PESTELL, R. G.; SOTGIA, F.; PHILP, N. J.; LISANTI, M. P. Evidence for a stromal-epithelial 'lactate shuttle' in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. **Cell Cycle**, v. 10, n. 11, p. 1772-1783, 2011.

WIGGINS, H. L.; RAPPOPORT, J. Z. An agarose spot assay for chemotactic invasion. **BioTechniques**, v. 48, n. 2, p. 121-124, 2010.

WILHELM, I.; MOLNÁR, J.; FAZAKAS, C.; HASKÓ, J.; KRIZBAI, I. A. Role of the blood-brain barrier in the formation of brain metastases. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 1, p. 1383-1411, 2013.

WINTER, M. J.; NAGELKERKEN, B.; MERTENS, A. E.; REES-BAKKER, H. A.; BRIAIRE-DE BRUIJN, I. H.; LITVINOV, S. V. Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. **Exp. Cell Res.**, v. 285, n. 1, p. 50-58, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Geneva, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 06 jan. 2016.

YAN, L. X.; HUANG, X. F.; SHAO, Q.; HUANG, M. Y.; DENG, L.; WU, Q. L.; ZENG, Y. X.; SHAO, J. Y. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. **RNA**, v. 14, n. 11, p. 2348-2360, 2008.

YANG, R. F.; YIN, J. X.; LI, Y. L.; ZIMMERMAN, M. C.; SCHULTZ, H. D. Angiotensin-(1-7) increases neuronal potassium current via a nitric oxide-dependent mechanism. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 300, n. 1, p. C58-C64, 2011.

YU, A. S.; MCCARTHY, K. M.; FRANCIS, S. A.; McCORMACK, J. M.; LAI, J.; ROGERS, R. A.; LYNCH, R. D.; SCHNEEBERGER, E. E. Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 288, n. 6, p. C1231-C1241, 2005.

YU, D.; TURNER, J. R. Stimulus-induced reorganization of tight junction structure: the role of membrane traffic. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1778, n. 3, p. 709-716, 2008.

YU, Q. Q.; WU, H.; HUANG, X.; SHEN, H.; SHU, Y. Q.; ZHANG, B.; XIANG, C. C.; YU, S. M.; GUO, R. H.; CHEN, L. MiR-1 targets PIK3CA and inhibits tumorigenic properties of A549 cells. **Biomed. Pharmacother.**, v. 68, n. 2, p. 155-161, 2014.

YUAN, J.; YANKNER, B. A. Apoptosis in the nervous system. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 802-809, 2000.

YUAN, S. T.; ELLINGROD, V. L.; SCHIPPER, M.; STRINGER, K. A.; CAI, X.; HAYMAN, J. A.; YU, J.; LAWRENCE, T. S.; KONG, F. M. Genetic variations in TGF $\beta$ 1, tPA, and ACE and radiation-induced thoracic toxicities in patients with non-small-cell lung cancer. **J. Thorac. Oncol.**, v. 8, n. 2, p. 208-213, 2013.

ZHANG, F.; HU, Y.; XU, Q.; YE, S. Different effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on vascular smooth muscle cell proliferation and migration. **PLoS One**, v. 5, n. 8, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012323.

ZHANG, J. G.; WANG, J. J.; ZHAO, F.; LIU, Q.; JIANG, K.; YANG, G. H. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Clin. Chim. Acta**, v. 411, n. 11-12, p. 846-852, 2010.

ZHANG, X.; ZHANG, Z.; DAI, F.; SHI, B.; CHEN, L.; ZHANG, X.; ZANG, G.; ZHANG, J.; CHEN, X.; QIAN, F.; HU, Y.; YUAN, Z. Comparison of circulating, hepatocyte specific messenger RNA and microRNA as biomarkers for chronic hepatitis B and C. **PLoS One**, v. 9, n. 3, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0092112.

ZHANG, Y.; LU, J.; SHI, J.; LIN, X.; DONG, J.; ZHANG, S.; LIU, Y.; TONG, Q. Central administration of angiotensin-(1-7) stimulates nitric oxide release and upregulates the endothelial nitric oxide synthase expression following focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. **Neuropeptides**, v. 42, n. 5/6, p. 593-600, 2008.

ZHANG, Z.; STIEGLER, A. L.; BOGGON, T. J.; KOBAYASHI, S.; HALMOS, B. EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. **Oncotarget**, v. 1, n. 7, p. 497-514, 2010.

ZHAO, Q.; ZHANG, B.; SHAO, Y.; CHEN, L.; WANG, X.; ZHANG, Z.; SHU, Y.; GUO, R. Correlation between the expression levels of miR-1 and PIK3CA in non-small-cell lung cancer and their relationship with clinical characteristics and prognosis. **Future Oncol.**, v. 10, n. 1, p. 49-57, 2014.

ZHENG, H.; SAITO, H.; MASUDA, S.; YANG, X.; TAKANO, Y. Phosphorylated GSK3 $\beta$ -ser9 and EGFR are good prognostic factors for lung carcinomas. **Anticancer Res.**, v. 27, n. 5B, p. 3561-3569, 2007.