

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**MARINA BONFOGO DA SILVEIRA**

**PEQUENOS RNAs NÃO DECODIFICADORES  
E SUA RELAÇÃO COM MOLÉCULAS DE  
ADESÃO E MIGRAÇÃO CELULAR EM  
CÉLULAS DE CARCINOMA PULMONAR  
HUMANO**

MARINA BONFOGO DA SILVEIRA

PEQUENOS RNAs NÃO DECODIFICADORES E SUA RELAÇÃO COM  
MOLÉCULAS DE ADESÃO E MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS  
DE CARCINOMA PULMONAR HUMANO

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

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Biociências da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de  
Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela e  
Licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2016

575.1  
S587p

Silveira, Marina Bonfogo

Pequenos RNAs não decodificadores e sua relação com moléculas de adesão e migração celular em células de carcinoma pulmonar humano / Marina Bonfogo Silveira. - Rio Claro, 2016

66 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientadora: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Genética. 2. miRNA hsa-miR-4465. 3. miRNA hsa-miR-513a-3p. 4. Câncer de pulmão. 5. Genética molecular. I. Título.

Dedico aos meus pais Celso e Rosana e à minha irmã Mariana por todo apoio afetivo e financeiro que me permitiram experiências de crescimento intelectual, cultural e pessoal.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à professora Dr.<sup>a</sup> Karen Cristiane Martinez de Moraes pela oportunidade de aprendizado e experiência que me proporcionou, por ser realmente uma orientadora por grande parte do meu percurso acadêmico e por depositar em mim confiança e responsabilidades para a realização desse trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular e também à professora Dr.<sup>a</sup> Márcia Cristina Brochetto Braga pelo compartilhamento de ideias e experiências. Em especial as pessoas de maior coração que já conheci, Brenda e Kelvin, pela amizade maravilhosa, pelos grandes ensinamentos e porque sem nossos esforços em conjunto esse trabalho não estaria finalizado.

Aos professores e professoras que me inspiraram e ainda me inspiram pelo seu grande conhecimento científico, militância e por me mostrarem o amplo papel do professor na sociedade.

Ao meu parceiro Fernando, por ser meu melhor amigo e confidente. Obrigada pela compreensão e paciência nos meus muitos momentos sombrios e pela motivação nos momentos de alegria.

Às amigas que fiz durante essa trajetória que foram cruciais para que chegasse ao final. Especialmente aos moradores da Porva, Gaga e Rapunzel, e as mulheres maravilhosas, Carol, Karina, Marina e Porteira, pelas risadas, conversas, segredos, compreensões e desavenças.

Aos meus pais, Celso e Rosana, pelo incentivo aos estudos, aos quais devo, em grande parte, a pessoa que sou hoje.

À minha irmã Mariana por encontrar em mim sua melhor amiga, sua irmã e seu ombro para chorar e rir. Obrigada por crescer e amadurecer comigo, por manter meus pés no chão e principalmente por ser a pessoa que me conhece melhor que eu mesma e ainda assim me amar incondicionalmente.

À FAPESP pelo financiamento que possibilitou a continuidade dessa pesquisa.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram nesse trabalho e na minha construção pessoal e profissional.

*“Deixe-me pensar: eu era a mesma quando me levantei esta manhã? Tenho uma ligeira lembrança de que me senti um pouco diferente. Mas se não sou a mesma, a próxima pergunta é: ‘Afinal de contas quem sou eu?’ Ah, este é o grande enigma!”*

(Lewis Carroll – Alice no País das Maravilhas)

## RESUMO

As proteínas relacionadas aos processos de adesão e migração celular possuem importante papel na biologia, no desenvolvimento e na diferenciação celular. Atualmente essas proteínas são estudadas em diversas áreas das Ciências Biológicas, como por exemplo, sua associação com cânceres humanos, mais especificamente suas funções em processos metastáticos. Proteínas como EpCAM, Claudina e Integrina- $\beta$ 8 também são alvo desses estudos, embora o conhecimento dessa correlação ainda seja controverso e obscuro. Interessantemente o mRNA dessas proteínas apresentam sítio de ligação comum aos miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p. Os miRNAs são pequenos RNAs não codificadores que podem se ligar a região 3'-UTR de mRNAs causando a parada da tradução ou a degradação desses mRNAs. Por possuir tal função, a relação da alteração de sua expressão com cânceres vem sendo investigada. Como as doenças tumorais são consideradas grave problema de saúde pública, nesse trabalho analisamos como a superexpressão desses miRNAs em células de carcinoma pulmonar humano afetam os processos de adesão e migração celular. Os resultados demonstraram que esses miRNAs quando superexpressados ocasionam alterações morfofuncionais nas células, tanto pela alteração da expressão de genes de adesão e migração, como pelo comportamento celular. Os clones que superexpressaram o miR-4465 apresentam aumento considerável do número de filamentos de actina (interação célula a célula), da expressão do gene *COL1A1* e alta capacidade de migração celular. Demonstrando que o miRNA hsa-miR-4465 pode ser considerado um marcador molecular da agressividade tumoral. Os resultados obtidos com a análise do hsa-miR-513a-3p apontaram diminuição considerável do crescimento das células, da capacidade migratória e da expressão do gene *ITGB8*. Dessa forma, podemos inferir que o hsa-miR-513a-3p participa no controle do processo de crescimento tumoral e mais estudos nos seus mecanismos de ação são importantes para melhor compreender seu detalhamento funcional. Os miRNAs estudados nesse trabalho demonstraram ser interessantes alvos de estudo de processos que envolvem células tumorais, potencialmente subsidiando, em longo prazo, o desenvolvimento de novos fármacos.

**Palavras-chave:** miRNA hsa-miR-4465. miRNA hsa-miR-513a-3p. Adesão / migração celular. Câncer de pulmão.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>7</b>  |
| 1.1 Câncer de pulmão, sua epidemiologia e a busca por terapias alternativas .....                     | 7         |
| 1.2 A relação entre o processo tumoral e os miRNAs.....   | 9         |
| 1.3 Adesão e migração das células na metástase e algumas moléculas envolvidas.....                    | 11        |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>   | <b>13</b> |
| 2.1 Objetivos gerais.....   | 13        |
| 2.2 Objetivos específicos.....  | 13        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>14</b> |
| 3.1 Cultura e tratamento de células.....  | 14        |
| 3.2 Análise de citotoxicidade.....  | 14        |
| 3.3 Clonagens e seleção dos clones.....   | 15        |
| 3.4 Transfecções e seleção dos clones A549-pEP-miR.....   | 18        |
| 3.5 Análises moleculares: a extração de RNA e as análises de expressão gênica.....                    | 19        |
| 3.6 Análises bioquímicas: mensuração de pH e lactato.....   | 22        |
| 3.7 Análises morfofisiológicas: ensaios de microscopia de fluorescência .....                         | 22        |
| 3.8 Imunofluorescência de FOXO1.....  | 23        |
| 3.9 Análises do tempo de duplicação, de padrão de crescimento e migração das culturas de células..... | 24        |
| 3.10 Análises estatísticas.....   | 25        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>26</b> |
| 4.1 Cultura de células e citotoxicidade.....  | 26        |
| 4.2 Clonagens e seleção dos clones.....   | 26        |
| 4.3 Transfecções e seleção dos clones A549-pEP-miR.....   | 29        |
| 4.4 A regulação da expressão gênica: as análises de PCR.....  | 30        |
| 4.5 Análises morfofuncionais: a microscopia de fluorescência.....                                     | 38        |
| 4.6 Imunofluorescência de FOXO.....   | 46        |
| 4.7 Análises bioquímicas: a produção de lactato e pH.....   | 48        |
| 4.8 Análise do padrão de crescimento e migração das culturas de células.....                          | 51        |
| <b>5 CONCLUSÕES.....</b>  | <b>57</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>59</b> |

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Câncer de pulmão, sua epidemiologia e a busca por terapias alternativas**

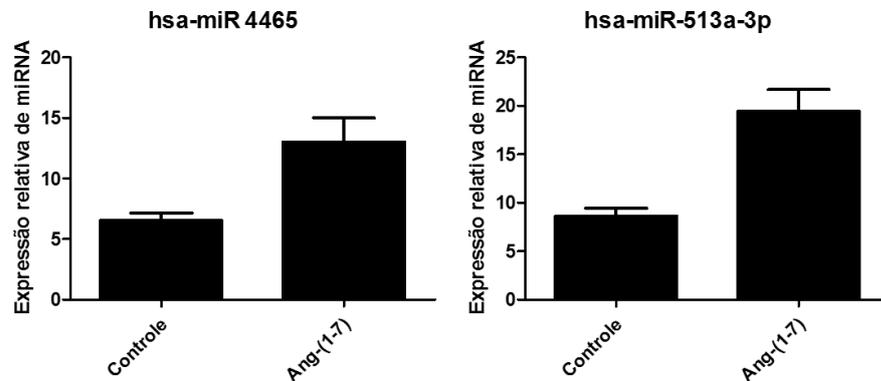
Câncer é um termo genérico utilizado para agrupar doenças caracterizadas pelo rápido crescimento de células anormais e que ocorre além dos seus nichos habituais. Essa patologia ocorre pela ação de agentes ambientais e fatores genéticos que interferem no equilíbrio das células de forma que ocorra falhas em um ou mais mecanismos que controlam a divisão, diferenciação e morte celular. Assim, a expressão gênica em células tumorais é alterada (FUTREAL et al., 2004; SANTARIUS et al., 2010). Essas células podem se desprender do tumor primário e se proliferarem para outras partes do corpo, sendo esse processo conhecido como metástase (Organização Mundial da Saúde, 2012). Cânceres são doenças complexas e embora crescentes o número de casos dessas doenças ainda está longe o desenvolvimento de terapias seguras e eficazes para a maioria dos casos (FUTREAL et al., 2004). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde de 2012 o câncer levou a óbito 8,2 milhões de pessoas e dentre seus diversos tipos, o câncer de pulmão foi responsável por 1,59 milhões de mortes no referido ano. Indiscutivelmente, o câncer de pulmão é uma problemática atual para a saúde pública mundial e estudos que procuram compreender os mecanismos moleculares dessa patologia são importantes no desenvolvimento de fármacos e aplicações biotecnológicas.

Dentro desse contexto, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo um estudo visando à elucidação de redes moleculares em células tumorais pulmonares e o efeito do peptídeo vasoativo Ang-(1-7) [Angiotensina-(1-7)] no controle desse processo. Esse heptapeptídeo endógeno é produzido pelo Sistema Renina-Angiotensina. Esse sistema está envolvido com a produção de moléculas que regulam a pressão sanguínea, a homeostasia hidroeletrólítica e a proliferação celular. A Ang-(1-7) foi descrito inicialmente por suas propriedades vasodilatadoras, anti-inflamatórias e anti-proliferativas, porém é considerado promissor no controle do crescimento do tumor e de sua metástase (GALLAGHER et al., 2011). Estudos mostraram que a Ang-(1-7) inibe o crescimento de células de câncer de pulmão humano *in vitro* e reduz o tamanho do tumor de pulmão humano em xenoinxertos *in vivo*, além de reduzir a densidade de vasos sanguíneos nesses (MENON et al., 2007; SOTO-PANTOJA et al., 2009).

Análises preliminares do nosso grupo demonstram alterações na fisiologia e uma redução significativa na taxa de crescimento de células tumorais pulmonares tratadas com Ang-(1-7). Também vem sendo estudada a correlação entre miRNAs que corregulam as moléculas COX-2/PTGS2 (ciclooxigenase-2), mediadora do processo inflamatório, a PTEN (fosfatase e tensina homóloga), uma supressora tumoral e o FOXO1 (fator transcricional *Forkhead box* da classe O1). Particularmente, considerando-se que o processo inflamatório é inerente aos tumores, a superexpressão da proteína COX-2 é observada em cânceres de pulmão e a Ang-(1-7) parece reduzir os níveis de COX-2 de maneira segura (MENON et al., 2007; GALLAGHER et al., 2011), mostrando-se novamente uma interessante molécula e forte candidata a supressão tumoral.

Embora muitas particularidades das vias correlatas ao processo inflamatório-pulmonar tenham sido descritas, nenhuma observação foi realizada na elucidação de miRNAs correlatos ao processo. Dentro desse contexto, o nosso grupo de pesquisa vem investigando os mecanismos da ação desse peptídeo em células de carcinoma pulmonar e uma possível modulação da expressão das proteínas COX-2, PTEN e FOXO1 por miRNAs. Análises preliminares de bioinformática demonstraram que os miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p possuem sítios prováveis de ligação nos mRNAs (RNAs mensageiros) das três moléculas investigadas. E, curiosamente, também foi observado um aumento significativo dos níveis dos desses miRNAs nas células tratadas com Ang-(1-7) (Figura 1). Além disso, as análises de bioinformática apontaram que sequências 3'-UTR de mRNAs de proteínas correlatas aos processos de adesão e migração também apresentam sequências consenso de ligação aos miRNAs investigados. Cabe a observação de que as proteínas de adesão e migração possuem importante papel na modificação das células tumorais que iram se disseminação de células para sítios distantes, caracterizando o processo de metástase (FRIEDL; ALEXANDER, 2011). Graças a essas modificações sistêmicas e morfológicas esse processo é em grande parte incurável por causa de sua natureza sistêmica e resistência das células disseminadas a tratamentos (VALASTYAN; WEINBERG, 2011). Assim, a regulação de proteínas de adesão e migração em células cancerígenas deve ser estudado para se compreender os mecanismos do câncer para enfim desenvolver novos fármacos que possam controlar esse grande problema de saúde pública.

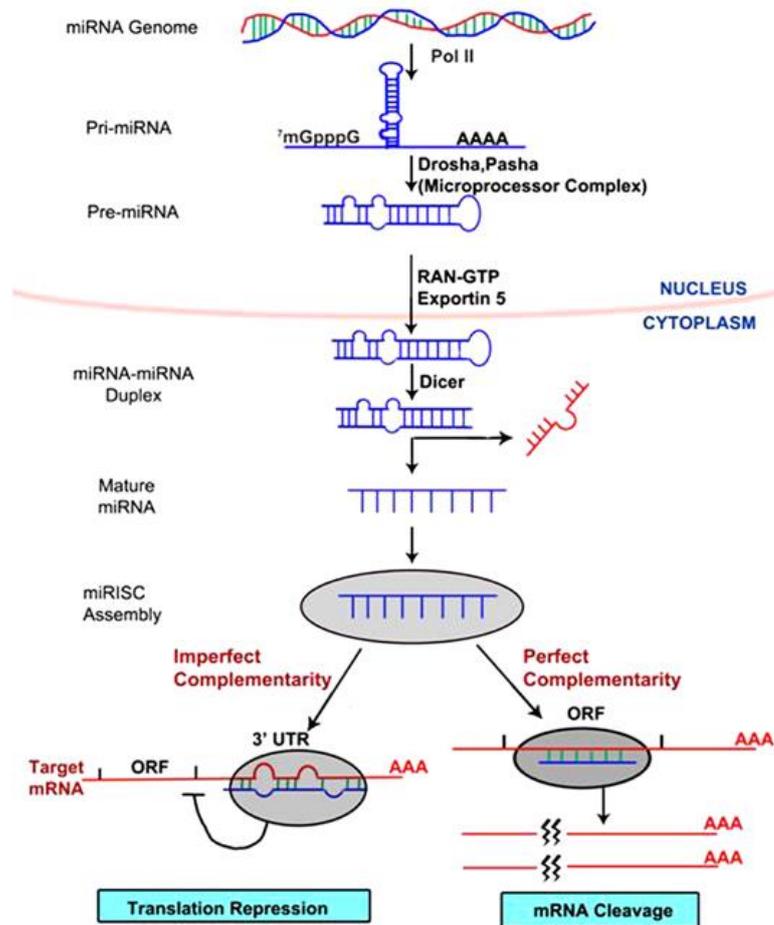
**Figura 1:** Expressão dos miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a3p em células A549 tratadas ou não (Control) com Ang-(1-7).



## 1.2 A relação entre o processo tumoral e os miRNAs

Para que ocorra o equilíbrio celular, o controle estrito dos mecanismos de divisão, diferenciação e morte celular deve estar presente. Quando um ou mais desses mecanismos falham as células podem desencadear a morte celular programada ou podem sobreviver e proliferarem-se descontroladamente, sofrendo alterações no seu padrão de expressão gênica e conduzindo a um quadro clínico conhecido como câncer (ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006). Sabe-se que inúmeros são os processos celulares que asseguram o equilíbrio celular, mas as particularidades desses mecanismos ainda não estão totalmente elucidadas. Entre os elementos que modulam a expressão gênica e o equilíbrio celular encontramos os miRNAs. Esses elementos se caracterizam como um grupo de pequenas moléculas de RNA não decodificadoras e que são transcritos ao longo do genoma como formas precursoras (ESAU; MONIA, 2007), sendo processadas no citoplasma em miRNAs maduros que apresentam aproximadamente 22 nucleotídeos. Esses miRNAs maduros se ligam a porção 3'-UTR (3'-não traduzida) de mRNAs específicos e podem então provocar a parada da tradução ou a degradação desse mRNA (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014) (Figura 2). A alteração na expressão de miRNAs foi encontrada em vários tipos de tumores, assim, detalhar as maneiras de ação de tais moléculas no controle do equilíbrio celular e o seu papel no desenvolvimento do processo tumoral é necessário para o desenvolvimento de novas terapias (LU et al., 2005; MENDEL; OLSON et al., 2012; HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014).

**Figura 2:** Biogênese e atuação de miRNAs de mamíferos.



Fonte: TONG, A. W.; NEMUNAITIS, J. 2008.

Para se compreender melhor a ação dessas pequenas moléculas e para se delinear possíveis redes de interações moleculares mediadas pelos miRNAs que embasam as alterações na fisiologia e na desaceleração no crescimento das células investigadas, e que auxiliarão na elucidação de particularidades de mecanismos de atuação do heptapeptídeo nas células tumorais, os miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p tornaram-se alvo dos estudos. Embora o miR-4465 não tenha sido muito estudado atualmente, um estudo envolvendo o miR-513a-3p demonstrou que ao ser superexpresso em células de adenocarcinoma pulmonar esse miRNA melhora a atuação do quimioterápico Cisplatina no processo apoptose dessas células (ZHANG et al., 2012). Nesse trabalho esses miRNAs foram investigados com o foco em adesão e migração de células, portanto moléculas envolvidas nesses processos foram investigadas.

### 1.3 Adesão e migração das células na metástase e algumas moléculas envolvidas

Metástase é um processo usual em cânceres e se caracteriza pela invasão de células tumorais em tecidos ou órgãos circunvizinhos e/ou distantes da localização inicial do tumor (KÜMPER; RIDLEY, 2010). Sabe-se que a metástase ocorre quando as células tumorais vencem as barreiras inerentes a tecido-especificidade onde proteínas de adesão e migração assumem papel central, facilitando o deslocamento das células tumorais para sítios distantes (PERL et al., 1998; BARCELLOS et al., 2013). Durante a metástase, diversos genes têm sua expressão modulada, e no que diz respeito à expressão de moléculas de adesão célula à célula e célula à MEC (matrix extracelular) a alteração é expoente (BEAVON, 2000; VALASTYAN; WEINBER, 2011). Assim, a análise das proteínas de adesão e de seus elementos moduladores na fisiopatologia tumoral pode ser apontada como um alvo central de investigações científicas, que poderá subsidiar futuras aplicações terapêuticas. Dentro desse contexto, a regulação fina da expressão de genes por miRNAs vem ganhando destaque. E, considerando-se o foco de investigação científica pelo nosso grupo, surgem as moléculas EpCAM (molécula de adesão epitelial), ITGB8 (Integrina- $\beta$ 8) e CLDN1 (proteína 1 contendo o domínio de Claudina) por possuírem sítios prováveis de ligação aos miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p.

Dentre as moléculas relacionadas com adesão e migração de células, EpCAM é uma proteína transmembrana glicosilada encontrada na superfície de células epiteliais que se correlaciona com as cascatas de sinalização associada com proliferação, diferenciação e apoptose celular (MÜNZ et al., 2004). Sua atuação na tumorigênese é discutível, pois, enquanto alguns autores defendem que EpCAM previne a propagação de células tumorais, outros afirmam que ela é necessária para o processo metastático (TAI et al., 2007; PATRIASCA et al., 2012). Já, as integrinas se caracterizam como receptores de MEC, possuindo importante papel na adesão célula a célula e nas interações da célula à MEC, além disso, elas também possuem função na regulação da migração, diferenciação e proliferação celular em tecidos de células normais ou tumorais (HYNES, 2002; SPEICHER et al., 2014). Um estudo recente mostrou que ao silenciar as subunidades de integrina há um retardamento da progressão do carcinoma hepatocelular (SPEICHER et al., 2014). Ainda, dentro do contexto de nossos estudos moléculas da família das Claudinas se tornam alvo de investigação. Essas são proteínas transmembranas cruciais na adesão celular e nos complexos de junção célula a célula, presentes em células epiteliais e endoteliais que formam uma

ultraestrutura organizacional correlacionada à aderência celular (FURUSE; TSUKITA, 2006; GAVARD; GUTKIND, 2008).

Paralelamente, reforçando uma regulação cruzada entre as moléculas que asseguram o equilíbrio celular e/ ou o processo tumoral, GAVARD; GUTKIND (2008) demonstrou que quando outra importante proteína de adesão celular, a VE-Caderina (caderina endotelial vascular), atua de maneira conjunta com a CLDN5 (Claudina 5) ocorre a inibição funcional das moléculas FOXO1 e  $\beta$ -Catenina, dois reguladores transcricionais. Porém, na ausência ou inativação de VE-Caderina, as concentrações de FOXO1 e  $\beta$ -Catenina aumentam no núcleo e ligam-se de maneira estável a região promotora do gene da CLDN5 inibindo a expressão da mesma. O estudo também sugere que a inativação de CLDN5 gera perda de força na adesão celular (GAVARD; GUTKIND, 2008). Entretanto detalhes do mecanismo desse processo ainda precisam ser elucidados. Como mencionado anteriormente, nosso grupo busca colaborar com a construção de uma rede de interação entre moléculas centrais do processo inflamatório tumoral que possam ser moduladas pelo peptídeo vasoativo Ang-(1-7) e que se conectem com as proteínas de adesão e migração celular e algumas análises preliminares reforçaram essas observações, justificando o interesse pelo estudo cruzado da regulação das proteínas de adesão e migração pelo processo de RNAi (interferência do RNA).

Assim, o estudo dos aspectos funcionais dos miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p em células de carcinoma pulmonar irá contribuir com a compreensão da biologia dos sistemas do processo inflamatório tumoral e sua modulação pelo peptídeo vasoativo Ang-(1-7), o que poderá contribuir, à longo prazo, com o desenvolvimento de novos fármacos que controlem o processo metastático.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

A presente proposta teve como objetivo analisar aspectos da funcionalidade dos miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p em cultura de célula tumoral pulmonar A549, e a sua correlação com os processos de adesão e migração celular.

### **2.2 Objetivos específicos**

**(I)** Clonar os miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p em vetores de expressão eucarioto e utilizar os mesmos na transfecção de células A549, além da subsequente seleção de clones;

**(II)** Analisar os efeitos morfofuncionais da superexpressão dos miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p nas células de carcinoma pulmonar A549 transfectadas pela investigação do núcleo e do citoesqueleto em ensaios de microscopia de fluorescência, mensuração de pH e lactato, além de ensaios de crescimento e migração celular. Os resultados obtidos nos ensaios realizados com os clones celulares serão comparados aos efeitos do heptapeptídeo Ang-(1-7);

**(III)** Acompanhar os níveis transcricionais de EpCAM, CLDND1 e ITGB8 nas células A549 e nos clones celulares e de genes correlatos ao processo de adesão e migração celular. Os resultados obtidos nos ensaios realizados com os clones celulares serão comparados aos efeitos do heptapeptídeo angiotensina-(1-7);

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cultura e tratamento de células

Células da linhagem A549 (*American Type Culture Collection*, ATCC: CCL-185) oriundas de adenocarcinoma pulmonar humano foram crescidas na ausência e/ou presença de  $10^{-7}$  M de Ang-(1-7) (VERANO-BRAGA et al., 2012) em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) / Ham's F12 suplementado com 10% de SBF (soro bovino fetal), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina à 37°C e em atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub>. As células transfectadas com o plasmídeo pEP-miR Controle (miRNASelect™ pEP-miR Null Control Vector; Cell Biolabs Inc.) e com os clones pEP-miR (miRNASelect™ pEP-miR Cloning and Expression Vector; Cell Biolabs Inc.) contendo os miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p também foram cultivadas em meio DMEM / Ham's F12 da maneira descrita acima com a adição de 0,8 µg/mL de puromicina. As células foram assim crescidas até aproximadamente 90% de confluência e utilizadas nos ensaios.

#### 3.2 Análise de citotoxicidade

Para se avaliar um possível efeito citotóxico da Ang-(1-7) às células A549, foram realizados ensaios de MTT (MOSMANN, 1983). As células foram cultivadas em placas de 96 poços da maneira descrita no item 3.1 e a citotoxicidade foi mensurada nas células A549 não tratadas, considerado o controle experimental, e nas células tratadas com  $10^{-7}$  M Ang-(1-7) nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Para isso, o meio da cultura celular foi substituído por meio fresco contendo o reagente MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, Sigma - Aldrich®) na concentração de 5 mg/mL seguido de uma incubação de 2 horas à 37°C e em atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub>. Após o referido intervalo, foram adicionados às culturas celulares 100 µl de DMSO (dimetil sulfoxido) e as células foram novamente incubadas nas mesmas condições descritas por um novo intervalo de 1 hora para solubilização dos cristais de formazan. Ao final da incubação, a absorbância das culturas celulares foi analisada em leitor de microplaca Spectra Count no comprimento de onda de 570 nm.

### 3.3 Clonagens e seleção dos clones

O DNA genômico das células não tratadas com Ang-(1-7) foi extraído adaptando-se metodologia descrita em SAMBROOK; GREEN (2012). Para isso, as células foram ressuspensas em uma solução contendo 0,15 M NaCl, 1% NP40, 0,1% SDS e 50 mM Tris-HCl pH 7,6. Após a lise celular, o DNA genômico foi precipitado e purificado utilizando-se extração com fenol-clorofórmio. A verificação da qualidade e concentração do DNA preparado foram avaliadas em espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare) utilizando a razão A260/A280 e A260/A230 ~ 2.0. Aproximadamente 50 ng de DNA foram utilizados em reações de PCR (polimerização em cadeia) para amplificar a região do genoma aonde se insere a sequência precursora dos miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p para as clonagens. Para esse fim, oligonucleotídeos específicos foram desenhados seguindo as orientações do fornecedor do plasmídeo (Cell Biolabs Inc.) e as sequências precursoras dos miRNAs foram inicialmente adquiridas do banco de dados miRBASE (<http://www.mirbase.org/>) e então analisada no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Após as análises e localização da sequência no genoma humano (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview>), foram consideradas as sequências precursoras dos miRNAs acrescida de 100 bases nos flancos (à montante e à jusante), para o desenho dos oligonucleotídeos. A essas sequências foram adicionados nucleotídeos correspondentes aos sítios das enzimas *Bam* HI e *Nhe* I aos oligonucleotídeos direto e reverso, respectivamente (Tabela 1).

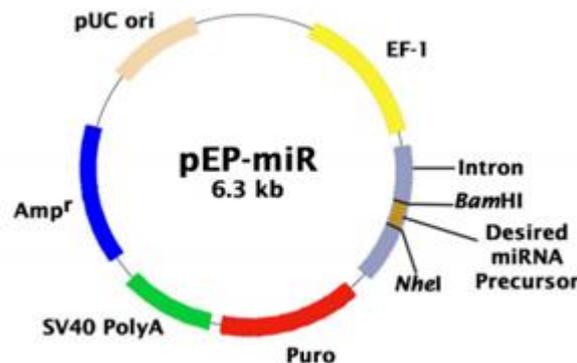
**Tabela 1:** Oligonucleotídeos iniciadores dos miRNAs hsa-miR-513a3p e hsa-miR-4465.

| miRNA                 | Oligonucleotídeos (5'-3')  |
|-----------------------|--|
| <i>hsa-miR-513a3p</i> | Direto: TCGAGGATCCAGGCACAAAAGTTCCTTGAAG<br>Reverso: TCGAGCTAGCGGGATGCCACATTCAGCCATTC |
| <i>hsa-miR-4465</i>   | Direto: TCGAGGATCCCTACAAAGGATGTTACAGTTG<br>Reverso: TCGAGCTAGCCAAGTTATATGCTATTGAAAC  |

A metodologia utilizada na reação de PCR, será detalhada no item 3.5. Após a amplificação, os fragmentos de PCR foram purificados com Agencourt AMPure XP PCR Purification (Beckman Coulter) e 6 µg destes foram devidamente digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Nhe* I seguindo as especificações do fornecedor das enzimas (New England Biolabs® Inc). Paralelamente, 2µg do vetor pEP-miR também foram digeridos com

as enzimas *Bam* HI e *Nhe* I. A Figura 3 apresenta o vetor com suas particularidades, como a presença de região de inserção de seqüências de DNA precursoras de miRNAs, região promotora EF-1 $\alpha$  (forte promotor eucarioto), marcador de resistência a puromicina (seleção para células mamíferas), marcador de resistência a ampicilina (seleção para bactérias), região de clivagem das enzimas *Bam* HI e *Nhe* I e outras características que viabilizam a sua utilização na seleção dos clones de células mamíferas. Os insertos e vetores digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para purificação dos fragmentos de interesse para clonagem. Os fragmentos alvo foram purificados com MinElute<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (Qiagen), e quantificados. Em seguida, utilizando-se orientações gerais de clonagem (SAMBROOK; GREEN, 2012), fragmentos de DNA purificados e correspondentes ao inserto a ser clonado e ao vetor digerido foram ligados em reações padrões de ligação utilizando-se cerca de 100 ng do vetor e cerca de 500 ng do inserto. As reações de ligação foram processadas em volumes de 10  $\mu$ L com 5U de T4 DNA Ligase (New England Biolabs<sup>®</sup> Inc), 2  $\mu$ L do tampão que acompanha a enzima, 1  $\mu$ L de BSA e 1mM de ATP por um intervalo de 16 horas a 11°C.

**Figura 3:** Representação esquemática do vetor de clonagem miRNASelect<sup>™</sup> pEP-miR Cloning and Expression Vector (Cell Biolabs Inc.).



Fonte: Cell Biolabs Inc.

Com o processamento das reações de ligação, os plasmídeos recombinantes foram utilizados na transformação de bactérias DH5 $\alpha$  (*F*-,  $\Phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ *M15*,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) *U169*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (*rk*-,*mk*+), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$ -, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*) adaptando-se metodologia descrita em Sambrook; Green (2012). Após a transformação bacteriana, as colônias obtidas e selecionadas em placas contendo meio de cultura Luria Bertani Agar (10g de Triptona, 5g de Extrato de Levedura, 171 mM NaCl e 15 g de Ágar) e ampicilina a 50  $\mu$ g/

mL foram analisadas através de PCR de colônias. Esta técnica consiste na realização de reações de PCR convencional sem o preparo prévio de DNA plasmideal. Para isso, utilizando condições assépticas e com o uso de ponteira estéril, cada colônia de interesse foi parcialmente coletada. Essas ponteiras, com pequenas porções das colônias de bactérias foram imersas em microtubos para reações de PCR, contendo os reagentes apropriados para a amplificação convencional e oligonucleotídeos iniciadores dos miRNAs de interesse (Tabela 1). Os produtos amplificados foram analisados em géis de agarose a 1%. Essa estratégia foi adotada, pois várias colônias foram obtidas pela transformação, e o vetor pEP-miR não possui marcador de seleção prévia colorimétrica para as colônias recombinantes. Dessa maneira uma pré-seleção foi necessária.

Em seguida, clones que amplificaram positivamente fragmentos correspondentes aos insertos foram submetidos a uma nova rodada de seleções para se evitarem falsos positivos. Assim, plasmídeos de dez colônias que apresentaram PCR positivos foram preparados. A preparação consistiu no crescimento das colônias em 3 mL de meio Luria Bertani líquido (1L: 10g de Triptona, 5g de Extrato de Levedura e 171mM NaCl) seguido de centrifugação em microtubos. Os precipitados foram tratados respectivamente com as soluções P1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA e 100 µg/ mL RNase) e P2 (200 mM NaOH, SDS 1%), seguido de precipitação dos plasmídeos com a solução P3 (3M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub>, pH 5,3) e isopropanol. Os plasmídeos precipitados foram lavados com etanol 70%, liofilizados e ressuspensos em água estéril. Em seguida foram utilizados em reações de digestão enzimática com *Nhe* I e *Bam* HI, para a seleção final de clones.

Clones selecionados foram preparados em maior escala por midi preparações de plasmídeos que consistem no crescimento das colônias em 100 mL de meio Luria Bertani líquido seguido de uma centrifugação em tubos de 50 mL. Os precipitados formados foram tratados respectivamente com as soluções P1, P2 e P3, o plasmídeo resultante foi lavado com isopropanol e 8 M LiCl, seguindo metodologia descrita em SAMBROOK; GREEN (2012). Após essa etapa, os plasmídeos foram tratados com 20 µg/mL de RNase A e 50 µg/mL de Proteinase K, por fim, foram purificados com fenol-clorofórmio e diluído em água estéril. Uma vez purificados, os plasmídeos foram enviados para as análises de sequenciamento no Centro de Genômica da ESALQ – Piracicaba/ SP. As reações de sequenciamento foram em equipamento ABI 3130 DNA Analyser (Thermo Fisher Scientific) e as reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, que se baseia na metodologia de Sanger. Considerando-se as especificidades dos clones, oligonucleotídeos apropriados foram utilizados nas reações de sequenciamento, pEP-miR-Seq

direto e pEP-miR-Seq reverso, (Tabela 2). As sequências obtidas foram analisadas com o software BioEdit v7.2.5 (Tom Hall – Ibis Biosciences) para se verificar e comprovar a eficácia das clonagens.

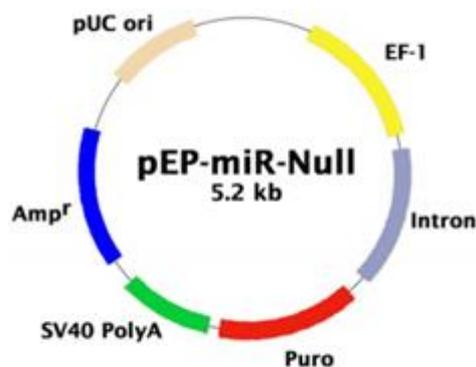
**Tabela 2:** Sequências dos oligonucleotídeos pEP-miR-Seq direto e pEP-miR-Seq reverso utilizados nas reações de sequenciamento.

| Gene                | Oligonucleotídeo (5'-3') |
|---------------------|--------------------------|
| pEP-miR-Seq direto  | TCCTCAGCCGTCGCTTCATG     |
| pEP-miR-Seq reverso | GTGTGGGGAAACTCCATCGC     |

### 3.4 Transfecções e seleção dos clones A549-pEP-miR

Após o sequenciamento e análises das sequências, os clones pEP-miR-4465 e pEP-miR-513a-3p, além do plasmídeo pEP-miR Controle (Figura 4) foram utilizados em reações de transfecção de células.

**Figura 4:** Representação esquemática do vetor de clonagem miRNASelect™ pEP-miR Null Control Vector (Cell Biolabs Inc.).



Fonte: Cell Biolabs Inc.

Para as transfecções, células A549 foram cultivadas em microplacas de 24 poços conforme descrito no item 3.1. Utilizando o reagente Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) e os plasmídeos purificados, adaptando as recomendações do fornecedor do reagente de transfecção, as reações de transfecção foram realizadas. Utilizando-se 1 µg de DNA plasmideal e Opti-MEM® Medium (Thermo Fisher Scientific), um meio de cultura com

baixa concentração de soro, o DNA e a Lipofectamina foram diluídos nas concentrações recomendadas pelo fornecedor. A mistura foi incubada por 10 minutos, e então adicionada diretamente às células, seguida de uma incubação de 6 horas. Decorrido o intervalo, o meio contendo a Lipofectamina foi removido e meio DMEM / Ham's F12 contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina foi adicionado. Após um intervalo de 24 horas, o meio da cultura celular completo foi substituído, contendo puromicina, o antibiótico para a seleção desses clones, na concentração final de 0,8 µg/mL. Essas culturas passaram por um processo de manutenção por várias semanas para estabelecimento de clones permanentes.

Em seguida, miRNAs das células transfectadas foram extraídos com o reagente comercial miRNAse mini kit (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Reações de PCR em tempo real foram realizadas para a verificação dos níveis de expressão dos miRNAs de interesse. Após a análise dos resultados, foi selecionado o clone celular com maior expressão do miRNA, quando da comparação com os níveis de expressão verificados no clone celular estabelecido pela transfecção de A549 com o plasmídeo pEP-miR Controle.

### **3.5 Análises moleculares: a extração de RNA e as análises de expressão gênica**

Para as análises de expressão gênica, as células foram coletadas por procedimento envolvendo tripisinização celular, processo que consiste na dissociação das células de maneira enzimática. Em seguida, as amostras foram utilizadas na extração de mRNAs (RNAs mensageiros) com a utilização de TRIZOL® Reagent (Thermo Fisher Scientific) e adaptando-se as recomendações do fabricante. O RNA extraído foi analisado em NanoVue™ Plus (GE Healthcare) e a razão A260/A280  $\geq 1.8$  foi respeitada na seleção das amostras utilizadas nas mensurações da expressão gênica. Para as análises subsequentes, 2 µg do mRNA de cada amostra foi utilizado em reações de transcrição reversa para preparo do cDNA (DNA complementar), seguindo as especificações do fabricante do High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific). Os cDNAs foram utilizados em reações de PCR. Rodadas de PCR para células transfectadas foram realizadas, assim como para as células tratadas e não tratadas com a Ang-(1-7). Na prática, para se poder fazer uma análise comparativa dos resultados obtidos, as culturas foram separadas em grupos, utilizando o uso de puromicina como critério. Dessa forma, dois grupos foram formados para a análise dos resultados, o grupo 1, contendo os resultados com as células A549 tratadas e não tratadas com Ang-(1-7), e o grupo 2, contendo os resultados das células transfectadas com o pEP-miR Controle e dos clones pEP-miR-4465 e pEP-miR-513a-3p.

A expressão dos genes *CLDND1*, *EpCAM* e *ITGB8* foram avaliadas por PCR quantitativa em tempo real. Outros genes como *CADM2* (molécula de adesão celular 2), *ICAM* (molécula de adesão intercelular) e *NCAM2* (molécula de adesão celular neural) também foram realizadas por qPCR, uma vez que suas expressões nas células do grupo 1 eram tão baixas que não foram observadas em PCR convencional. As reações de PCR quantitativa em tempo real foram processadas utilizando-se SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems® - ThermoFisher Scientific™), em placas de 96 poços e vedadas com o selo óptico (Applied Biosystems® Micro Amp® Optical Adhesive Film – Thermo Fisher Scientific™). As reações foram montadas para um volume final de 10 µl e cada reação continha 0,75 µM de oligonucleotídeos (Tabela 3), 2 µl de cDNA diluído 10 vezes e 5 µl de SYBR® Green PCR Master Mix. As reações de PCR foram realizadas conforme programação contida no aparelho Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR.

Continuando as análises de expressão de genes de proteínas de adesão e migração de células, reações de PCR convencional semi-quantitativa foram processadas para se avaliar a expressão de *BAG4* (BCL2 associado à atonogene 4), *COL1* (Colagenase 1), *ECAD* (E-Caderina), *FNI* (Fibronectina 1), *FGF2* (fator de crescimento fibroblástico 2), *ITGA4* (Integrina α4), *NCAD* (N-Caderina), *PCDH8* (Protocaderina 8) e *VCAM* (molécula de adesão celular vascular). A Tabela 3 apresenta as sequências dos oligonucleotídeos utilizados na experimentação.

Para a realização das reações usuais de PCR semi-quantitativa, o termociclador Mastercycler® Pro S (Eppendorf) foi utilizado. Cada reação continha 2 µl de cDNAs (de uma diluição prévia de 1:10 dos RNAs equitativamente transcritos), 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos (dNTP), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de oligonucleotídeos específicos, tampões e enzima Taq DNA polimerase (0,025 U/ µl). Para cada conjunto de oligonucleotídeos, foram realizados 30 ciclos de amplificação que consistiram em uma denaturação a 95°C por 1 minuto, seguido de um anelamento por 1 minuto - com temperaturas específicas de anelamento (T<sub>M</sub>) para cada conjunto de oligonucleotídeos utilizados (direto e reverso), e extensão a 72°C por 3 minutos. Após as amplificações, os produtos foram analisados em gel de agarose a 1% corado com GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) e fotografados em MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging System). A quantificação relativa das bandas foi realizada com a utilização de *softwares* apropriados como Quantity One (Bio-Rad) e/ ou Image-J (programa de domínio público desenvolvido pelo *National Institute of Health*, USA). Os oligonucleotídeos para os genes em estudo (Tabela 4) foram desenhados utilizando sequências depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for*

*Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). A Tabela 3 apresenta a sequência dos oligonucleotídeos utilizados. As análises moleculares foram realizadas em triplicatas.

**Tabela 3:** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR convencional semi quantitativa e quantitativa em tempo real.

| Gene                             | Oligonucleotídeos (5'-3')                                     |
|----------------------------------|---|
| <i><math>\beta</math>-actina</i> | Direto: CGGGACCTGACTGACTAC<br>Reverso: CTCCTTAATGTCACGCAC     |
| <i>BAG4</i>                      | Direto: CATGTGCTGGAGAAGGTC<br>Reverso: TTCCAGTATGGCCTGAA      |
| <i>CADM2</i>                     | Direto: CGACTCCTTTTCCACAA<br>Reverso: GTAATTCTCCGCCATCCT      |
| <i>CLDND1</i>                    | Direto: CTCCTGACAATGTATCC<br>Reverso: ATGAAGAGAGCAGAAGCC      |
| <i>COL1</i>                      | Direto: ATGACGTGATCTGTGACGAG<br>Reverso: AAATTCCTCCGGTTGATTTC |
| <i>ECAD</i>                      | Direto: ACACTTCTGCTGATCCTGTC<br>Reverso: TTCTGGTTATCCATGAGCTT |
| <i>EpCAM</i>                     | Direto: GGTTGTGGTGATAGCAGTTG<br>Reverso: GCCTTCTCATACTTTGCC   |
| <i>FGF2</i>                      | Direto: GAGAAGAGCGACCCTCAC<br>Reverso: ATAGCTTTCTGCCCAGGT     |
| <i>FNI</i>                       | Direto: ACGCATCACTTGCACTTCTA<br>Reverso: CCACAGAGTAGACCACACCA |
| <i>ICAM</i>                      | Direto: ATGGGCAGTCAACAGCTA<br>Reverso: TAAGGTTCTTGCCCCTG      |
| <i>ITGA4</i>                     | Direto: CGCTTCAGTGATCAATCC<br>Reverso: CTCCATAGCAACCACCAG     |
| <i>ITGB8</i>                     | Direto: AGATTGCTGCTGGTGATG<br>Reverso: ACAGTTTCCGTCATTGGG     |
| <i>NCAD</i>                      | Direto: CACAGATTCGGGTAATCCTC<br>Reverso: CTTCTCCTCCACCTTCTTCA |
| <i>NCAM2</i>                     | Direto: TTGCCGAGTTAGCAGTTC<br>Reverso: CATAGCGAACCGATTGTC     |
| <i>PCDH8</i>                     | Direto: ACGAGCGTCAGGACACCTAC<br>Reverso: TGTCATTGACGTCTCGGATG |
| <i>VCAM</i>                      | Direto: GGAGCTACAGCCTCTTTCTG<br>Reverso: ATTCATATACTCCCGCATCC |

Interessantemente, alguns desses genes escolhidos para a análise, também possuem na porção 3'-UTR de seus mRNAs putativas regiões de interação com um ou ambos dos miRNAs investigados nesse trabalho. Para a caracterização e identificação de sequências alvo foram utilizados algoritmos disponíveis gratuitamente tais como MiRDB (<http://mirdb.org/miRDB>) e TargetScanHuman (<http://www.targetscan.org/>). A Tabela 4 apresenta os miRNAs em estudo e seus alvos potenciais.

**Tabela 4:** Genes que possuem um potencial sítio de ligação entre seus mRNAs e os miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p.

| hsa-miR-4465 | hsa-miR-513a-3p |
|--------------|-----------------|
| BAG4         | FGF2            |
| ITGA4        | ITGA4           |
| NCAM2        | PCDH8           |

### 3.6 Análises bioquímicas: mensuração de pH e lactato

Considerando-se o tratamento das células A549 com a Ang-(1-7) (grupo 1) e os clones celulares (grupo 2), os sobrenadantes e os extratos celulares foram coletados e análises bioquímicas realizadas. Análises usuais de mensuração de lactato e pH foram processadas em triplicatas técnicas e biológicas. As células foram crescidas em frascos de 75cm<sup>2</sup> como descrito no item 3.1 e alíquotas de seu sobrenadante foram coletadas quando a cultura celular atingiu aproximadamente 90% de confluência. Para a mensuração de lactato foi utilizado o Lactato Enzimático Kit (Labtest), seguindo as especificações do fabricante. Dessa forma, 1 mL de uma mistura na proporção 4:1 do Reagente 1 e Reagente 2 do *kit* mencionado foi adicionada a 0,01 mL da amostra alíquotada. Após a homogeneização, a reação foi incubada a 37°C por 5 minutos, seguido de leitura de absorbância em leitor espectrofotométrico (Biomate 3, Thermo Fisher Scientific™) em comprimento de onda igual a 550 nm. As análises do pH das amostras foram realizadas utilizando fitas color pH fast® Indicator Strips pH 5-10, que foram imersas nos microtubos contendo o sobrenadante celular coletado.

### 3.7 Análises morfofisiológicas: ensaios de microscopia de fluorescência

As análises de microscopia de fluorescência foram realizadas seguindo procedimentos previamente padronizados pelo nosso grupo de pesquisa. Para essas análises, células

previamente crescidas de acordo com as especificações anteriores (item 3.1), foram coletadas, diluídas na proporção de 1:10 em PBS (tampão fosfato-salino 1x = 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), e contadas em uma câmara de Neubauer, seguindo metodologia usual. Para isso, as células diluídas foram depositadas na câmara e os quatro quadrantes periféricos foram contados; a média da soma foi multiplicada pelo fator de diluição (10) e pelo fator de correção da câmara (10<sup>4</sup>) para se determinar o número de células coletas.

Após a contagem celular, 1,5 X 10<sup>4</sup> de células A549 do grupo 1 e do grupo 2 foram semeadas em lamínulas contidas em microplacas de 24 poços e cultivadas apropriadamente. As células foram crescidas até a confluência de aproximadamente 90% e, então, fixadas por 5 minutos a 37°C em paraformaldeído a 3,8% contendo 0,2% de Triton X-100. As lamínulas com as células fixadas foram utilizadas em ensaios de marcação de citoesqueleto e núcleo.

Para a marcação de citoesqueleto e núcleo as lamínulas foram lavadas sucessivamente com PBS 0,5 X, a distribuição dos filamentos de actina foram investigadas pela coloração com faloidina-TRITC e a morfologia do núcleo foi realizada pela contra coloração do com DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato). Para isso, o tampão fosfato foi retirado e as lamínulas contendo as células foram incubadas por um intervalo de 2 horas em 200 µl de solução contendo BSA (albumina bovina sérica) a 1% em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada uma solução de BSA a 1% contendo faloidina-TRITC na concentração de 100 µg/ mL; a incubação foi processada por mais 2 horas a temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens com PBS 0,5 X, o núcleo foi corado com DAPI na concentração de 3,33 ng/ mL diluídas em 0,5 X PBS por 3 minutos a temperatura ambiente. Novamente, sucessivas lavagens com tampão PBS 0,5 X foram realizadas e as lamínulas foram finalmente montadas em lâminas apropriadas com N-propilgalato. Em seguida, as lamínulas foram analisadas com o auxílio de um microscópio de fluorescência modelo BX51 OLYMPUS acoplado a um sistema fotográfico.

### **3.8 Imunofluorescência de FOXO1**

Para essas análises, as células foram fixadas em lamínulas conforme descrito no item 3.7. Para a marcação de FOXO1 as lamínulas foram lavadas sucessivamente com PBS 0,5 X, o tampão fosfato foi retirado e as lamínulas contendo as células foram incubadas por um intervalo de 12 h em 100 µL de solução contendo o anticorpo específico de FOXO1 diluído na proporção 1:200 em TBS (solução tampão de tris) à 20°C. Em seguida, sucessivas

lavagens com PBS 0,5 X foram realizadas, e uma marcação com FITC foi realizada. Para isso 200 µl de FITC na proporção 1:50 foi adicionada às lamínulas e essa solução foi incubada durante 4 horas à temperatura ambiente. O núcleo também foi corado com DAPI na concentração de 3,33 ng/ mL diluídas em 0,5 X PBS por 3 minutos a temperatura ambiente. Novamente, sucessivas lavagens com tampão PBS 0,5 X foram realizadas e as lamínulas foram finalmente montadas em lâminas apropriadas com N-propilgalato. Em seguida, as lamínulas foram analisadas com o auxílio de um microscópio de fluorescência modelo BX51 OLYMPUS acoplado a um sistema fotográfico.

### **3.9 Análises do tempo de duplicação, de padrão de crescimento e migração das culturas de células**

Para se avaliar as taxas de crescimento das células A549, tratadas ou não com o heptapeptídeo e ainda para se avaliar comparativamente o efeito da superexpressão dos miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p no crescimento das culturas celulares, os seguintes procedimentos foram adotados. Após a contagem,  $1,5 \times 10^4$  células de todos os grupos foram semeadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> e estas crescidas e acompanhadas até que a cultura atingisse confluência total. Em seguida, as células foram tripsinizadas e contadas em câmaras de Neubauer. O padrão do crescimento das culturas foi calculado levando-se em consideração o TD (tempo de duplicação) das mesmas e utilizando-se a seguinte equação:  $TD = t * \ln(2) / \ln(A / A_0)$ , aonde  $A_0$  corresponde ao número de células iniciais,  $A$  é o número de células nas garrafas em confluência e  $t$  é o número de horas que as culturas demoraram para atingir a confluência nas garrafas (CASTILHO-FERNANDES et al., 2011).

Ainda para se investigar aspectos do crescimento celular das células A549 na presença ou ausência do heptapeptídeo e dos clones que superexpressam miRNAs foi realizado o ensaio de cura (*wound healing*). Os ensaios de cura subsidiam análises de crescimento/ migração celular. Para esses ensaios, as células foram crescidas em microplacas de 24 poços até que atingissem confluência. Em seguida, foi realizada uma ranhura de aproximadamente 2 cm nas culturas em monocamada com a ponta de uma ponteira estéril. No momento da ranhura e após 24 horas da ranhura foram tiradas fotografias e as imagens foram analisadas com auxílio do programa Image J. Pontos de referência foram marcados no fundo das placas para se viabilizar as análises das taxas de migração e o decréscimo percentual nas áreas das “feridas” foram comparados entre os grupos e plotados em gráficos.

Para os ensaios de migração celular, foi realizada a metodologia denominada gotas de agarose adaptando-se o protocolo descrito em WIGGINS; RAPPOPORT (2010). Para tal, uma solução de PBS 1X contendo agarose na concentração de 1% foi preparada em cabine de fluxo laminar. Antes de sua polimerização essa solução foi diluída na proporção 1:2 de duas maneiras, em PBS 1X, representando o controle negativo, e em meio de cultivo contendo soro bovino fetal. Gotas de 10  $\mu$ L foram aplicadas em placas de 6 poços e após a polimerização foram utilizadas nos ensaios. Para tal,  $2 \times 10^5$  células dos diferentes grupos foram semeadas nas placas de 6 poços contendo as gotas de agarose e 1 mL de meio de cultura completo (especificações descritas no item 2.1). Nos intervalos de 24, 48 e 72 horas foram tiradas fotografias da região da gota onde havia a maior quantidade de células. As células visualizadas nas fotos que migraram pela gota de agarose foram contabilizadas. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os pontos de referência foram marcados no fundo das placas para se viabilizar as análises das taxas de migração.

### **3.10 Análises estatísticas**

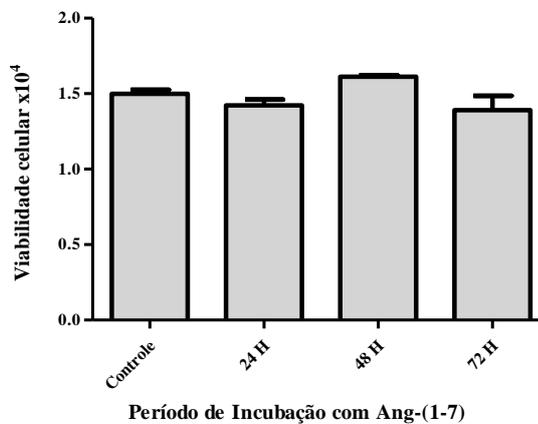
As análises estatísticas dos resultados foram geradas com o programa GraphPad, versão 5.0 (Prism Inc.) utilizando-se *One way* ANOVA seguido pelo teste de *Dunnett* de maneira distinta entre os grupos. Para o grupo 1 foi considerado como controle as células A549 e para o grupo 2 foi considerado as células A549 transfectadas com o plasmídeo pEP-miR Controle. Será adotado o valor  $p < 0.05$  para significância estatística.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Cultura de células e citotoxicidade

Para analisar o potencial citotóxico da Ang-(1-7) na concentração de  $10^{-7}$ M (VERANO-BRAGA et al., 2012) às células A549, foram realizados ensaios de MTT. Os resultados desses ensaios, após o tratamento com Ang-(1-7) nos períodos de 24, 48 e 72 horas, demonstraram que não há alterações significativas na viabilidade das células em nenhum dos intervalos analisados, o que é relevante para as análises laboratoriais subsequentes (Figura 5). Os resultados foram ainda analisados por *One Way* ANOVA (n=3), seguido pelo teste de *Dunnett*.

**Figura 5:** Análise de viabilidade celular. Células A549 foram incubadas ou não (controle) por diferentes intervalos (24, 48 e 72 horas) com o peptídeo Ang-(1-7) a  $10^{-7}$  M e a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde \*\*\*p < 0.0005, \*\*p < 0.005, \*p < 0.05.



### 4.2 Clonagens e seleção dos clones

Seguindo metodologia descrita anteriormente, foram clonadas as sequências precursoras dos miRNA hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p no vetor pEP-miR (Figura 3). Os plasmídeos obtidos foram então preparados na concentração de 200 ng/ $\mu$ L para serem sequenciados pelo método de Sanger, como descrito anteriormente. As sequências obtidas foram analisadas e confirmaram a clonagem das sequências correspondentes aos miRNAs. As

sequências clonadas são apresentadas nas Figuras 6 e 7 abaixo. Em rosa a região correspondente a sequência dos miRNAs maduros.

**Figura 6:** Sequência do clone pEP-miR-513a-3p contendo a sequência precursora do miRNA hsa-miR-513-3p. Em rosa a sequência do miRNA maduro.

### Sequência do clone do miR-513-3p

```

1   CCTTTTCCAAACCTAAAGACGACGTACTCCAAAAGCTCGAGCTAAGCGGG
51  ATGCCACATTCAGCCATTCAGTGTGCAGTGCCTTTCACAGGGAGGTGTCT
101 CATTATGTGAACTAAAATATAAATTTACCTTTCTGAGAAGGGTAATGT
151 ACAGCATGCACTGCATATGTGGTGTCCCTGAGGATGGGGTGTAGCTGCG
201 AGCATGGTGATGCCTGTTTTGCATCCTGTGCACCCACTCCTCAGTGCTGG
251 GCTACACTTCAAGGAACTTTTTGTGCCTGGATCCTCGAGAACTAATCGAG
301 GTGCCTGGACGGCGCCCGGTACTCCGTGGAGTCACATGAAGCGACGGCTG
351 AGGACGGAAAGGCCCTTTTCTTTGTGTGGGTGACTCACCCGCCCGCTCT
401 CCCGAGCGCCGCGTCTCCATTTTGAGCTCCCTGCAGCAGGGCCGGGAAG
451 CGGCCATCTTTCCGCTCACGCAACTGGTGCCGACCGGGCCAGCCTTGCCG
501 CCCAGGGCGGGGCGATACACGGCGGCGGAGGCCAGGCACCAGAGCAGGC
551 CGGCCAGCTTGAGACTACCCCCGTCCGATTCTCGGTGGCCGCGCTCGCAG
601 GCCCCGCCTCGCCGAACATGTGCGCTGGGACGCACGGGCCCCGTGCCCCG
651 CCGCGGCCCCAAAAACCGAAATACCAGTGTGCAGATCTTGCCCCGCATTT
701 ACAAGACTATCTTGCCAAAAAAGCGTTCGAGATATCATCAAAAATT
751 TTAAATGGCTAGAGACTTATCGAAAGCAGCGAGACAGGCGGAAGGTGCC
801 ACCAGATTCGCACGCGCCGGCCCCAGCGCCCAGGCAGCCTCACTCAGCAC
849 GAGCGAAGGGCTCCTTTAGCCGCAAGGCCTTCGAACTCTTCCAACCCC

```

**Figura 7:** Sequência do clone pEP-miR-4465 contendo a sequência precursora do miRNA hsa-miR-4465. Em rosa a sequência do miRNA maduro.

#### Sequência do clone do miR-4465

```

1   TGGCCGAAAACGGGGGCGCCGTCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGGATC
51  CCTACAAAGGATGTTACAGTTGAATTTGTCAAGTTCGTTTCTTAGACAGC
101 CCTGCTCTGGTCTAGCCCAAGCTCTCATGTGTCCCCTGGTCACGCTATTT
151 GAGGTTTACTATGGAACCTCAAGTAGTCTGACCAGGGGACACATGAGAGC
201 TTTTCATTGATTGCATTTCCACAAGCATATTTCCATCACAAGTGGGGCAT
251 GTATCTCTTGTGTTGGTTTGTGTTTTAGTTTTCAATAGCATATAACTTGGCTA
301 GCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTAT
351 GCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGC
401 TTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGAT
451 CTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAAACAGTGGTTCAAAGT

```

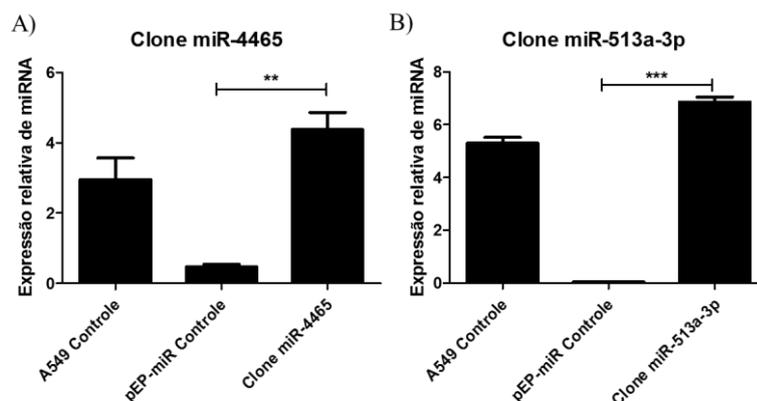
O vetor pEP-miR foi projetado para a clonagem e expressão de precursores de miRNAs na sua estrutura de grampo com os sítios prováveis que garantem a interação com a maquinaria de processamento endógena da célula, levando a clivagem correta dos miRNAs. O vetor é caracterizado pela presença de região de processamento de miRNAs, região promotora EF-1 $\alpha$  (forte promotor eucarioto), marcador de resistência a puromicina (seleção para células mamíferas), e outras particularidades que viabilizam a sua utilização na seleção dos clones de células mamíferas.

A Figura 8 representa esquematicamente os grampos contendo sequências precursoras dos miRNAs clonados e em destaque (rosa) a sequência madura.



seleção de clones permanentes, o cultivo foi realizado por várias semanas, para que a transfecção se tornasse estável. Em seguida os níveis da expressão dos miRNAs de interesse foram caracterizados por PCR quantitativa em tempo real e os clones que mais expressaram os miRNAs foram selecionados para as análises subsequentes. A seleção dos clones baseou-se na mimetização dos efeitos do peptídeo vasoativo Ang-(1-7) que também aumenta os níveis de expressão desses miRNAs nas células A549 (Figura 1B). A Figura 9 apresenta os resultados obtidos nas PCRs e cabe a observação de que todas as análises dos clones que contêm os miRNAs foram realizadas em relação ao clone contendo o vetor pEP-miR Controle, considerando-se que estes são crescidos nas mesmas condições de cultivo e em meio contendo puromicina.

**Figura 9:** Níveis de expressão dos miRNAs nas células A549 (controle) e nas células transfectadas com o pEP-miR Controle e com os clones pEP-miR-4465 (A) ou pEP-miR-513a-3p (B). As expressões dos miRNAs foram obtidas pelo método de PCR quantitativa em tempo real. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os gráficos plotados utilizando-se o *software* Graph Pad Prism 5; as análises estatísticas foram calculadas utilizando-se ANOVA, seguida do pós-teste de *Dunnet* onde \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$  e \*\*\*  $p < 0.0005$ .



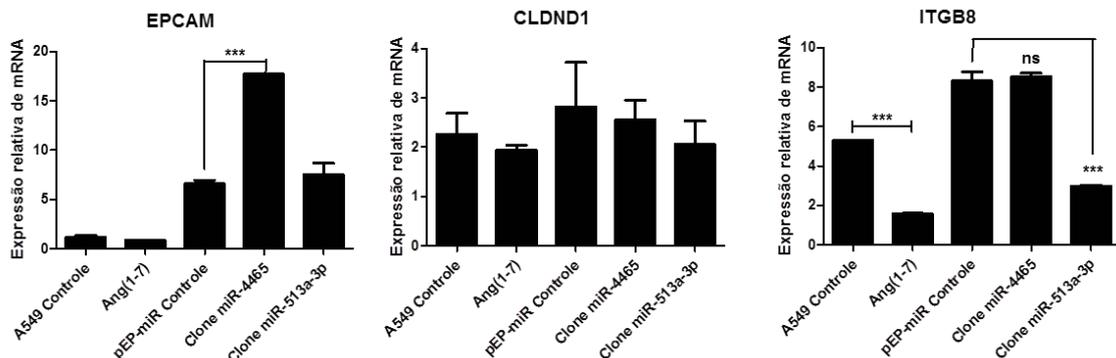
#### 4.4 A regulação da expressão gênica: as análises de PCR

Após o cultivo das células A549 na presença ou ausência do heptapeptídeo e das culturas dos clones celulares, mRNAs foram avaliados espectrofotometricamente ( $A_{260}/A_{280} \sim 2.0$ ) e então utilizados em reações de transcrição reversa. A qualidade do experimento e das transcrições reversas foram avaliadas por reações de PCR convencional semi quantitativa com o gene normalizador  $\beta$ -actina. É pressuposto que esse gene conserve o seu padrão de expressão independentemente do tratamento celular. Os produtos dessas reações foram

submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e ao analisar o resultado foi possível inferir que o cDNA possuía qualidade, pois este apresentou características de um DNA íntegro, demonstrando que as técnicas de extração de RNA e transcrição reversa foram bem executadas.

Em seguida, reações de PCR quantitativa em tempo real para os genes *CLDND1*, *ITGB8* e *EpCAM* foram realizadas. De forma intrigante o mRNA dos genes *CLDND1*, *EpCAM* e *ITGB8* também possuem sítios prováveis de interação aos dois miRNAs em estudo. A expressão desses genes foi avaliada em células tratadas ou não tratadas com Ang-(1-7), assim como clones celulares. Os resultados são apresentados na Figura 10.

**Figura 10:** Níveis de expressão relativa dos mRNAs *CLDND1*, *EpCAM* e *ITGB8* em células A549 tratadas ou não com  $10^{-7}$  M de Ang-(1-7), e nos clones pEP-miR. As análises foram realizadas em triplicatas e as expressões dos mRNAs foram obtidas pelo método de PCR quantitativa em tempo real, sendo os gráficos plotados utilizando-se o *software* Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way* ANOVA seguido pelo teste de *Dunnnett*, onde  $***p < 0.0005$ ,  $**p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$ . O teste de *Dunnnett* foi realizado separadamente para o grupo 1, considerando a célula A549 como controle, e grupo 2, considerando a célula transfectada com o plasmídeo pEP-miR Controle como controle.

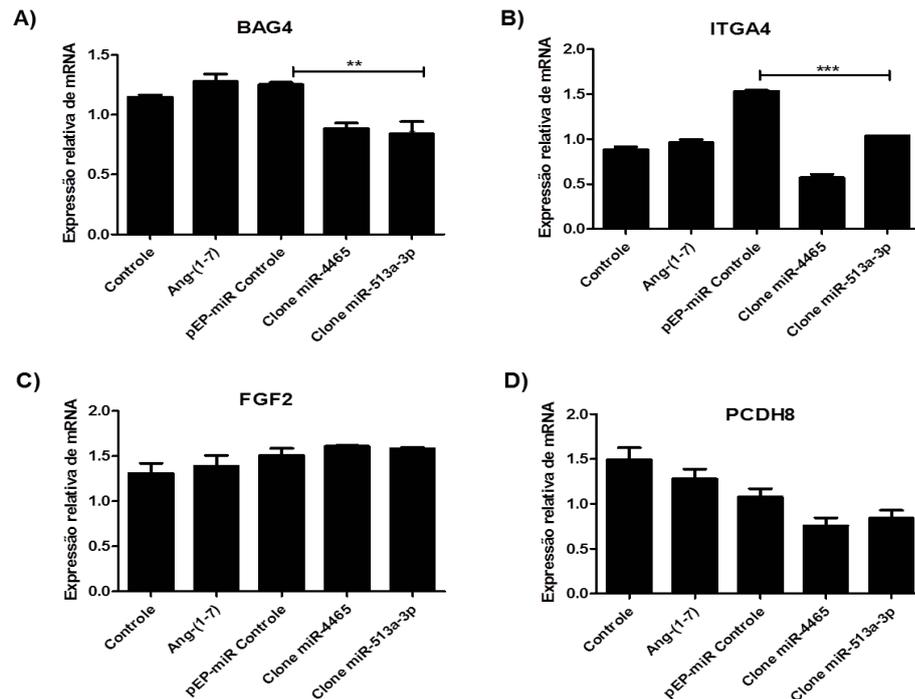


As análises da expressão dos genes entre as células tratadas e não tratadas com Ang-(1-7) permitiram inferir que tanto para o gene *EPCAM*, quanto para o gene *CLDND1* não houve nenhuma alteração significativa na expressão. Já para *ITGB8* foi encontrado uma diferença estaticamente relevante na expressão do mRNA entre o controle e a célula tratada, nesse caso houve uma redução na expressão do mRNA destes nas células tratadas em relação ao controle. Interessantemente, um estudo envolvendo a célula A549 e o silenciamento de *ITGB8* demonstrou que nas células *ITGB8*- silenciadas houve diminuição da adesão celular e da habilidade de invasão das células (XU; WU, 2012). A diminuição desse gene em nossos ensaios se torna promissor ao controle da migração e adesão celular.

Em relação aos clones, as análises foram realizadas tomando-se o pEP-miR Controle como referência. Nesse caso, observa-se um aumento na expressão de EPCAM no clone que superexpressa o miRNA hsa-miR4465. Embora, não haja muitos estudos que correlacionem esse gene com o miRNA hsa-miR-4465, em XU et al. (2014) maiores níveis de expressão de EPCAM se correlaciona com uma maior agressividade do tumor. Quanto a ITGB8 uma expressão significativamente reduzida foi observada no clone miR-513a-3p, quando da comparação com o clone pEP-miR Controle. Assim como ocorreu no tratamento com Ang-(1-7), o que se torna interessante, além do já mencionado outro estudo envolvendo o silenciamento de subunidades de integrina mostrou um retardamento da progressão do carcinoma hepatocelular (SPEICHER et al., 2014). A diminuição desse gene em nossos ensaios se torna promissor ao controle da migração e adesão celular.

Além dessas análises, a expressão de outros genes correlacionados aos processos de adesão e migração celular, que possuem sítios prováveis de interação aos miRNAs em estudo, também foram investigados. A Figura 11 apresenta os resultados obtidos para a expressão dos genes *BAG4*, *ITGA4*, *NCAM2*, *FGF2* e *PCDH8*.

**Figura 11:** Níveis de expressão relativa dos mRNAs dos genes *BAG4*, *ITGA4*, *FGF2* e *PCDH8* células A549 tratadas ou não com  $10^{-7}$  M de Ang-(1-7), e nos clones pEP-miR. As análises foram realizadas em triplicatas e as expressões dos mRNAs foram obtidas pelo método de PCR convencional semi quantitativa, sendo os gráficos plotados utilizando-se o *software* Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way* ANOVA seguido pelo teste de *Dunnett*, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ . O teste de *Dunnett* foi realizado separadamente para o grupo 1, considerando a célula A549 como controle, e grupo 2, considerando a célula transfectada com o plasmídeo pEP-miR Controle como controle.



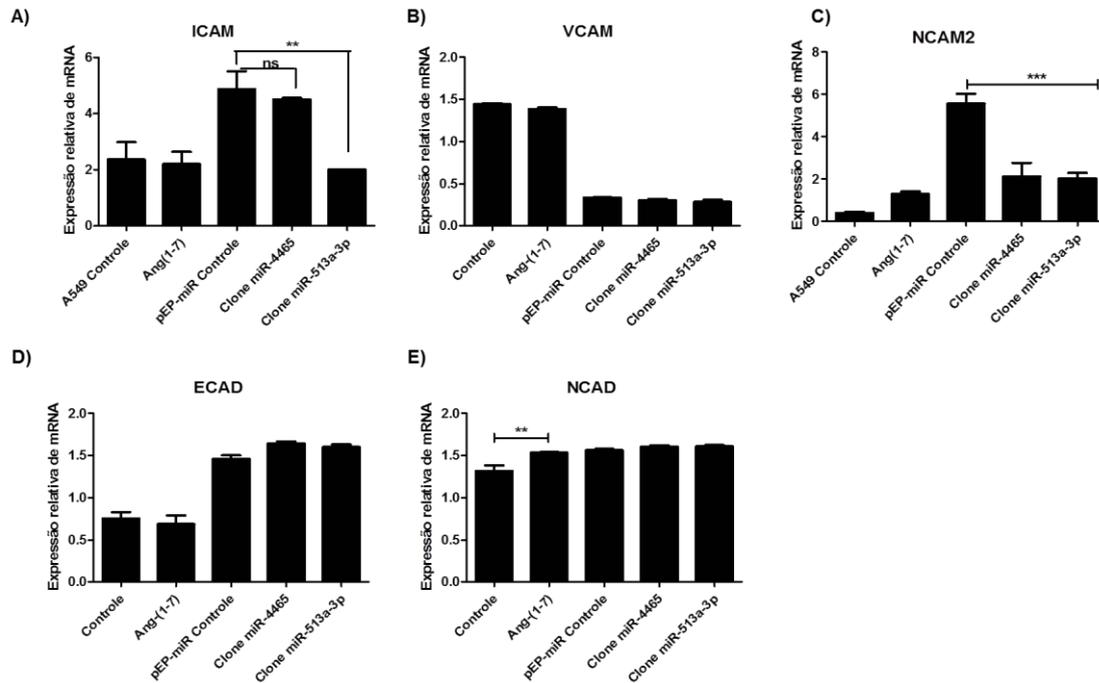
Os resultados aqui apresentados apontam maior variação estatística entre os clones pEP miR (-4465 e -513a-3p) e pEP-miR Controle (grupo 2) do que entre as células tratadas e não tratadas com Angiotensina-(1-7), grupo 1. Alterações significativas foram observadas para a expressão dos genes *BAG4* e *ITGA4*, nos clones pEP-miR, quando da comparação com o padrão de expressão encontrada para esses genes no clone celular pEP-miR Controle. Particularmente, *BAG4* caracteriza-se como uma proteína que se correlaciona a mecanismos anti-apoptóticos e também funciona como uma reguladora negativa da chaperona hsp70 (LAU; CHAN, 2003). Mais do que isso, alguns estudos apontam o envolvimento dessa proteína numa condição patológica denominada monoletrix, uma doença genética rara que se caracteriza por problemas na pele e cabelo, entre outras alterações fenotípicas, devido a alterações no citoesqueleto. Interessantemente, a redução nos níveis de expressão do gene *BAG4* reduz consideravelmente nos clones, quando da comparação de seus níveis no clone pEP-miR Controle, o que reforça a existência de mecanismos de alterações morfofuncionais

nas células. As análises complementares das alterações do citoesqueleto e do padrão de migração dos clones, que serão apresentadas em seções posteriores, reforçam essas análises, corroboram o importante papel dos miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p na modulação do equilíbrio celular.

Para o gene de *ITGA4*, as análises também apontam a existências de alterações significativas na expressão do mesmo nos clones pEP-miR. Estudos preliminares apontam que *ITGA4* é responsável pela expressão de um receptor de MEC da família das integrinas, importante para o extravasamento de células na corrente sanguínea (ROSE; HAN; GINSBERG, 2002). Além disso, um estudo recente demonstrou que essa integrina está associada com a ativação da metástase, tornando-se um elemento potencial no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (YOUNG et al., 2015). A redução dos níveis de expressão desse gene nos clones A549 sugere que reduções nos processos de migração celular possam estar acontecendo. Ainda, considerando-se os resultados apresentados na Figura 11, nem o importante fator mitogênico FGF2 (LINDNER et al., 1991; CAO et al., 2003), nem PCDH8, uma proteína que desempenha um papel crucial na adesão, migração, invasão e proliferação celular (MORRIS et al., 2011; LIN et al., 2014), apresentaram alterações estatisticamente significativas nas condições analisadas, considerando-se as análises estatísticas realizadas para os dois Grupos (1 e 2).

Continuando nossas análises, outros mRNAs de proteínas de adesão e migração de células foram avaliados. A Figura 12 apresenta os resultados para a análise dos níveis transcricionais de *ICAM*, *VAM*, *NCAM2*, *ECAD* e *NCAD*.

**Figura 12:** Níveis de expressão relativa dos mRNAs dos genes *ICAM*, *VCAM*, *NCAM2*, *ECAD* e *NCAD* em células A549 tratadas ou não com  $10^{-7}$  M de Ang-(1-7), e nos clones pEP-miR. As análises foram realizadas em triplicatas e as expressões dos mRNAs foram obtidas pelo método de PCR, sendo os gráficos plotados utilizando-se o *software* Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way* ANOVA seguido pelo teste de *Dunnett*, onde  $***p < 0.0005$ ,  $**p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$ . O teste de *Dunnett* foi realizado separadamente para o grupo 1, considerando a célula A549 como controle, e grupo 2, considerando a célula transfectada com o plasmídeo pEP-miR Controle como controle.



A molécula de adesão intercelular *ICAM*, que se caracteriza como uma glicoproteína, apresentou redução significativa em seus níveis no clone pEP-miR-513a-3p, quando da comparação com o clone pEP-miR Controle. Interessantemente, alguns estudos apontam o importante papel dessa proteína na formação de estruturas de adesão celular tipo junções de oclusões (*tight junctions*). A redução em seus níveis no clone que superexpressam o miRNA 513a-3p reforça o papel dos mesmos nos mecanismos de adesão celular.

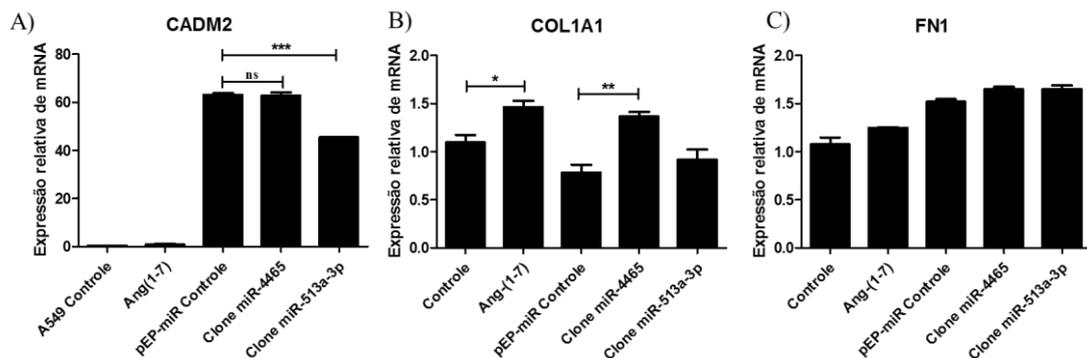
Paralelamente, outras duas proteínas de adesão tiveram os seus níveis de seus transcritos analisadas. Para *VCAM* não foi observada alterações transcricionais. Já a proteína *NCAM2* apresentou variações significativas entre os clones pEP-miR investigados. A considerável redução da expressão do gene nos clones pEP-miR-4465 e pEP-miR-513a-3p, quando da comparação com o clone controle é promissora. Estudos preliminares sugerem que a proteína esteja correlacionada com processos de migração celular em tumores e mais recentemente em TAKAHASHI et al. (2011) observa-se que o controle dos níveis de *NCAM2* pode ser considerado como uma importante estratégia terapêutica. Dessa maneira, a redução nos níveis

transcricionais de NCAM2 sugere que a superexpressão dos miRNAs atua de maneira positiva controlando os mecanismos de invasão e migração celular.

Em relação aos genes correlatos a caderinas, ECAD e NCAD foram investigados, considerando-se que são proteínas de adesão e que também podem ativar vias de sinalização. Entretanto, a expressão de tais moléculas não apresentou variações consideráveis nos clones celulares.

Considerando-se ainda os processos de adesão de células e de moléculas correlatas, os níveis transcricionais dos genes *CADM2*, *COL1A1* e *FN1* foram avaliados. A Figura 13 apresenta os resultados.

**Figura 13:** Níveis de expressão relativa dos mRNAs dos genes *CADM2*, *COL1A1* e *FN1* em células A549 tratadas ou não com  $10^{-7}$  M de Ang-(1-7), e nos clones pEP-miR. As análises foram realizadas em triplicatas e as expressões dos mRNAs foram obtidas pelo método de PCR, sendo os gráficos plotados utilizando-se o *software* Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way* ANOVA seguido pelo teste de *Dunnnett*, onde  $***p < 0.0005$ ,  $**p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$ . O teste de *Dunnnett* foi realizado separadamente para o grupo 1, considerando a célula A549 como controle, e grupo 2, considerando a célula transfectada com o plasmídeo pEP-miR Controle como controle.



As análises demonstram altos níveis de expressão da proteína CADM2 nos clones celulares, diferentemente do observado nas células A549 tratadas ou não com o heptapeptídeo. A alta expressão pode se correlacionar com a presença dos plasmídeos pEP-miR e/ou com a presença de puomicina no meio de cultura. A proteína CADM2 correlaciona-se a organização estrutural do citoesqueleto celular por se interagir com espectrinas, mas ao mesmo tempo a redução dos níveis dessas moléculas se correlaciona com a agressividade do tumor. Em HE et al., (2013), os autores demonstram que essa proteína atua como um supressor tumoral em cânceres renais. Em nossas análises, uma redução significativa nos níveis de CADM2 é observada nas células que superexpressam o miR-513a-3p, quando da comparação com o controle pEP-miR Controle. Entretanto, para uma

comprovação fisiológica sobre a superexpressão de miRNAs e a agressividade dos tumores, análises mais pontuais precisam ser realizadas num futuro próximo.

Em relação ao padrão de expressão do gene *COL1A1* interessantes observações podem ser apontadas. Esse gene é um dos responsáveis pela produção de fibrilas de colágeno do tipo I, que colabora com a reestruturação da MEC e que de maneira direta ou indireta se correlaciona com a metastáse (BARKAN et al., 2010). Um estudo recente, demonstrou que a expressão de genes correlacionados com processos celulares de adesão e migração assim como com a remodelação da MEC correlacionam-se com o mal prognóstico da sobrevivência de pacientes com cânceres renais, nesse caso a expressão exacerbada de *COL1A1* foi destacada (BOGUSLAWSKA et al., 2015). Em nossos ensaios, os efeitos da Ang-(1-7) nas células A549 aumentam a expressão de *COL1A1* em aproximadamente 50%. Ao mesmo tempo, nos clones celulares pEP-miR, um aumento significativo da expressão do gene *COL1A1* foi significativo no clone que superexpressa o miR-4465, o que também desponta como um alvo de questionamentos para futuras validações experimentais sobre as características fisiológicas da expressão dos miRNAs em estudo.

Finalizando, a expressão do gene *FNI* não apresentou variações estatísticas nas condições avaliadas. *FNI* é um gene que codifica um dos componentes da MEC e exerce uma importante função na adesão e migração celular e está envolvido com invasão tumoral e metástase (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999) e quando ativo promove metástase em alguns tipos de células tumorais, incluindo células de câncer de pulmão (MALIK et al., 2010). Em nossas análises, em nenhuma das condições avaliadas foram observadas alterações na expressão do gene.

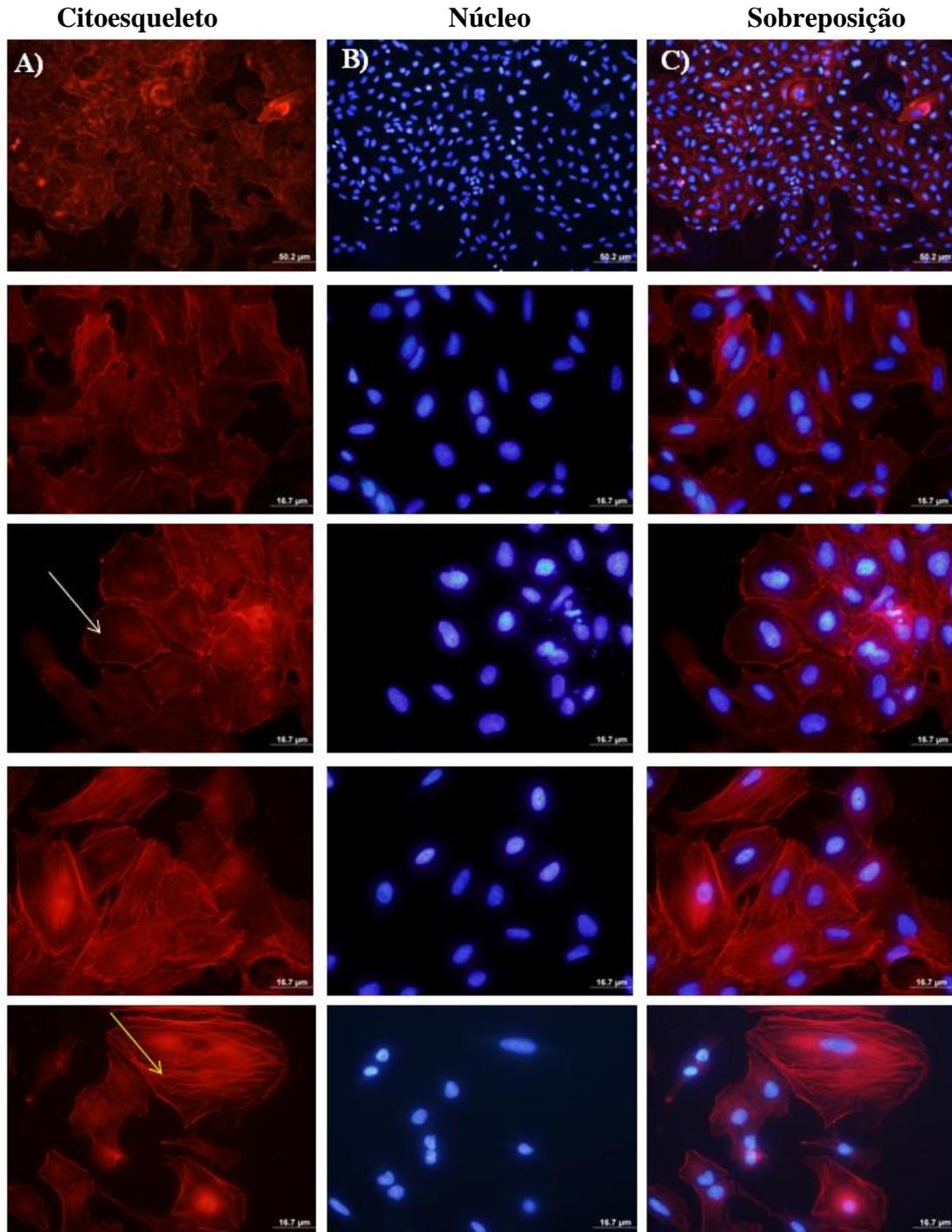
Em conjunto, as análises de mensuração de expressão gênica demonstram resultados interessantes: por um lado observamos que a superexpressão dos miRNAs em estudo modulam genes, que colaboram negativamente com o crescimento e migração celular (*ITGA4*, *NCAM2*), assim como com a alteração da morfologia das células (*BAG4* e *ICAM*). Por outro lado, a modulação da expressão dos genes *CADM2* e *COL1A1*, observada frente à superexpressão dos miRNAs, sugere uma correlação com uma maior agressividade do tumor, mas para tal afirmação novas investigações mais pontuais precisam ser realizadas. Comparativamente, as alterações nos níveis transcricionais dos genes acima apontados, quando da presença do heptapeptídeo Ang-(1-7) nas culturas celulares, não foram significativas, o que pode ser justificado pela alteração transcricional de vários miRNAs nas células tratadas com Ang-(1-7), o que colabora para o equilíbrio sistêmico. Nesse trabalho

objetivamos investigar os efeitos pontuais de dois miRNAs de maneira independente, o que nem sempre gera alterações fisiológicas positivas.

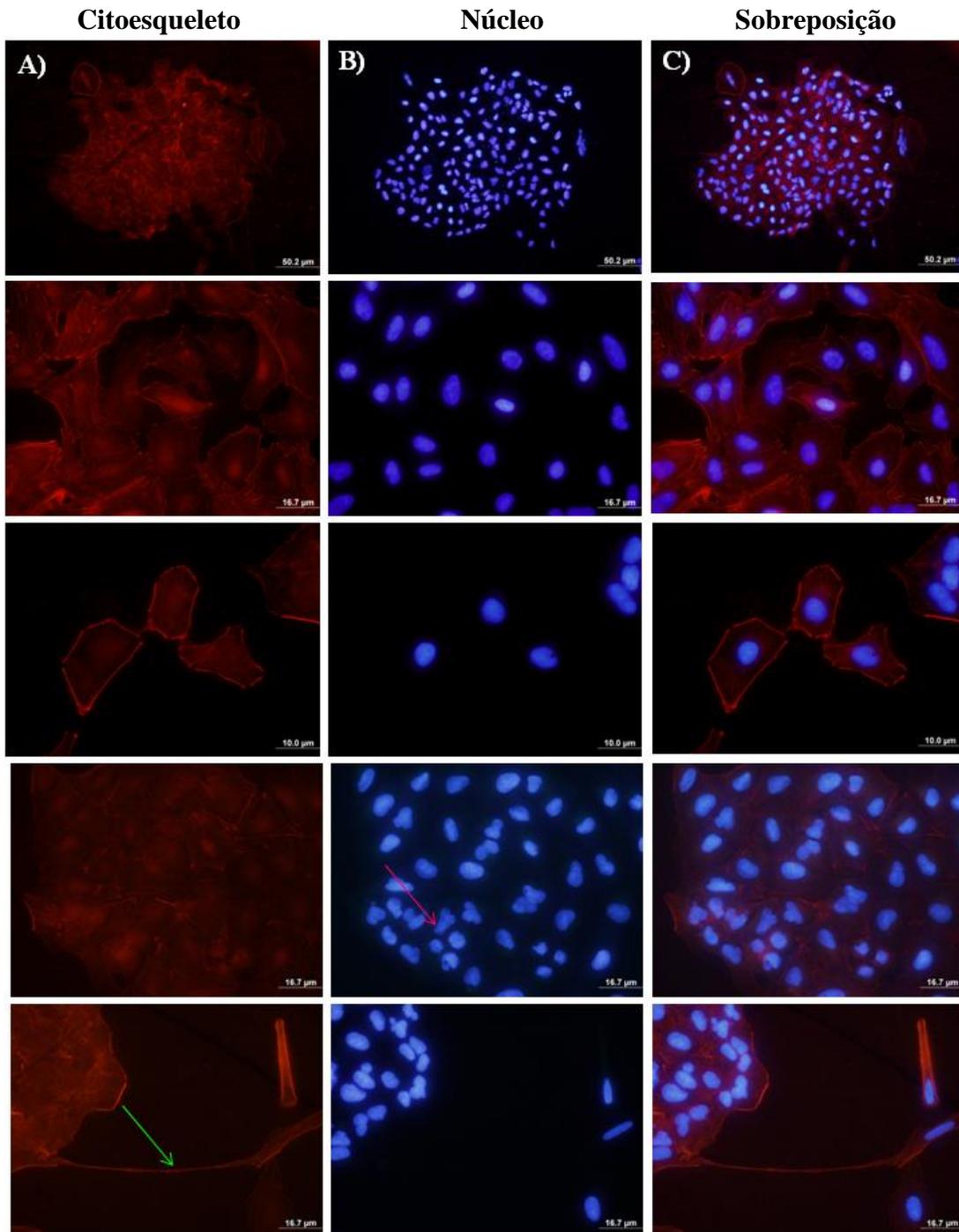
#### **4.5 Análises morfofuncionais: a microscopia de fluorescência**

Análises de microscopia de fluorescência foram realizadas para se avaliar os efeitos morfofuncionais do heptapeptídeo Ang-(1-7) nas células A549 na arquitetura celular. Além disso, a investigação da distribuição dos filamentos de actina do citoesqueleto auxilia na compreensão do processo de adesão e migração celular, foco desse trabalho. Para essas análises foram realizadas colorações do citoesqueleto por Faloidina-TRITC e do núcleo por DAPI. A Figura 14 apresenta os resultados obtidos para as análises das células A549 crescidas em condições regulares de cultivo e não tratadas com o heptapeptídeo. Essas condições de cultivo foram consideradas como nosso controle experimental do grupo 1. Já a Figura 15 corresponde aos resultados obtidos para as análises das células A549 crescidas com  $10^{-7}$  M de Ang-(1-7).

**Figura 14:** Microscopia de fluorescências de células A549 crescidas em condições regulares. As células foram coradas com Faloidina-TRITC e DAPI. A) Coloração Faloidina-TRITC, citoesqueleto em vermelho; B) Coloração DAPI, núcleo em azul; C) Sobreposição das figuras a e b; Seta branca: Filamentos de actina despolimerizados; Seta amarela: Filamentos de actina polimerizados.



**Figura 15:** Microscopia de fluorescências de células A549 crescidas na presença de  $10^{-7}$  M de Ang-(1-7) e coradas com Faloidina-TRITC e DAPI. A) Coloração Faloidina-TRITC, citoesqueleto em vermelho; B) Coloração DAPI, núcleo em azul; C) Sobreposição das figuras a e b; Seta rosa: deformações no núcleo e micronúcleo; Seta verde: alongamento do filamento de actina.



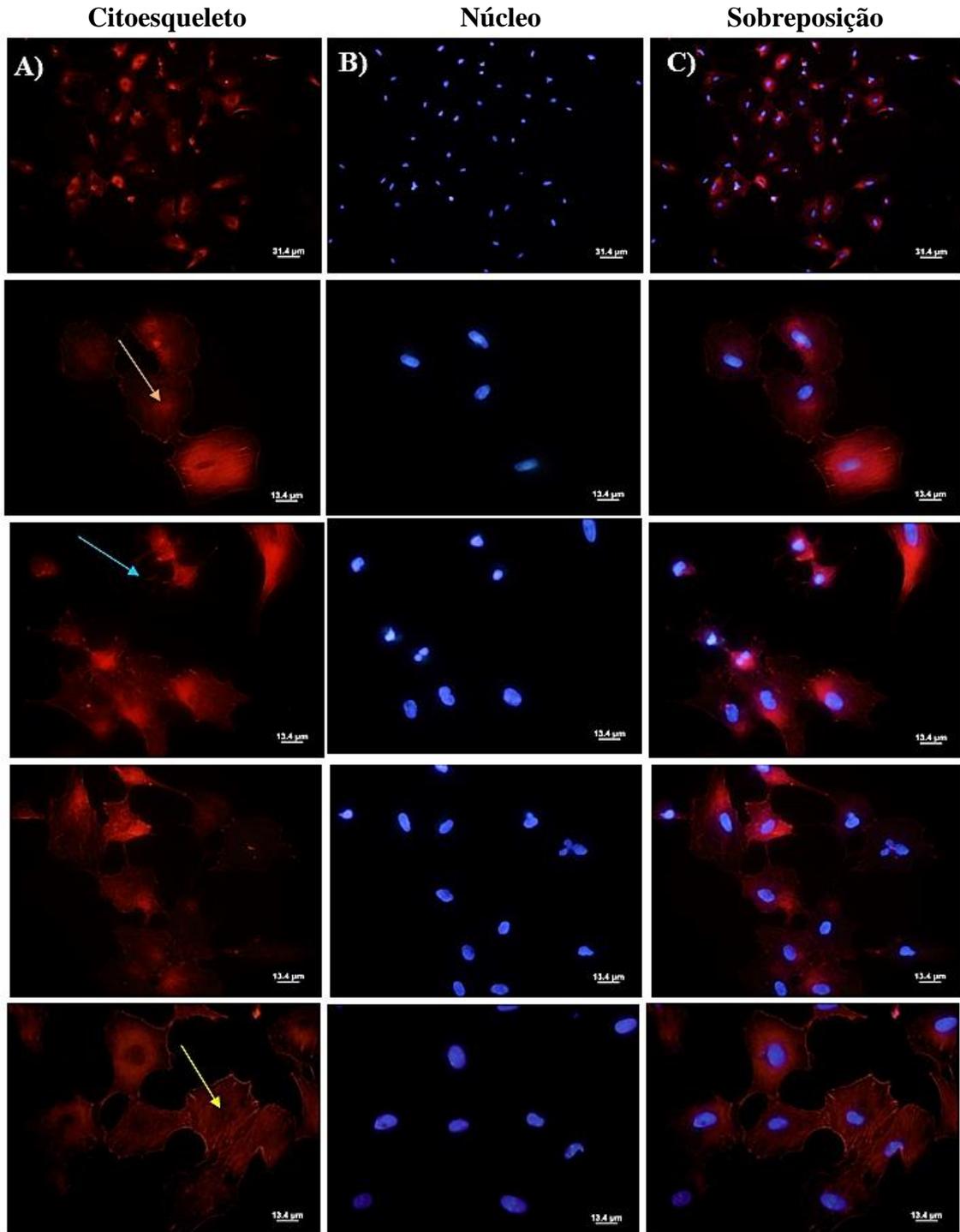
Em conjunto, as análises das fotomicrografias revelaram nenhuma mudança significativa no citoesqueleto e/ou no núcleo das células A549 quando comparadas as duas condições de cultivo (tratamento ou ausência dele). Entretanto, as análises microscópicas

revelam diversos comportamentos celulares. As células A549 parecem rearranjar seus filamentos de actina quando em contato célula-célula (seta-branca - Figura 14). Além disso, é possível verificar alterações no padrão de organização dos filamentos de actina, que ora se apresentam polimerizados (seta-amarela - Figura 14), ora despolimerizadas (seta-branca - Figura 14), sugerindo migração, crescimento e divisão celular. Também é possível observar um alongamento do citoesqueleto (seta verde) que se assemelha muito as fibras de estresse de actina. Esse padrão da disposição desse tipo de fibra pode ser evidenciado em outras fotomicrografias, mais evidenciado na seta amarela. As fibras de estresse de actina são estruturas contráteis de células não musculares mamíferas que possuem um papel importante no processo de adesão e migração celular e na morfogênese (TOJKANDER; GATEVA; LAPPALAINEN, 2012).

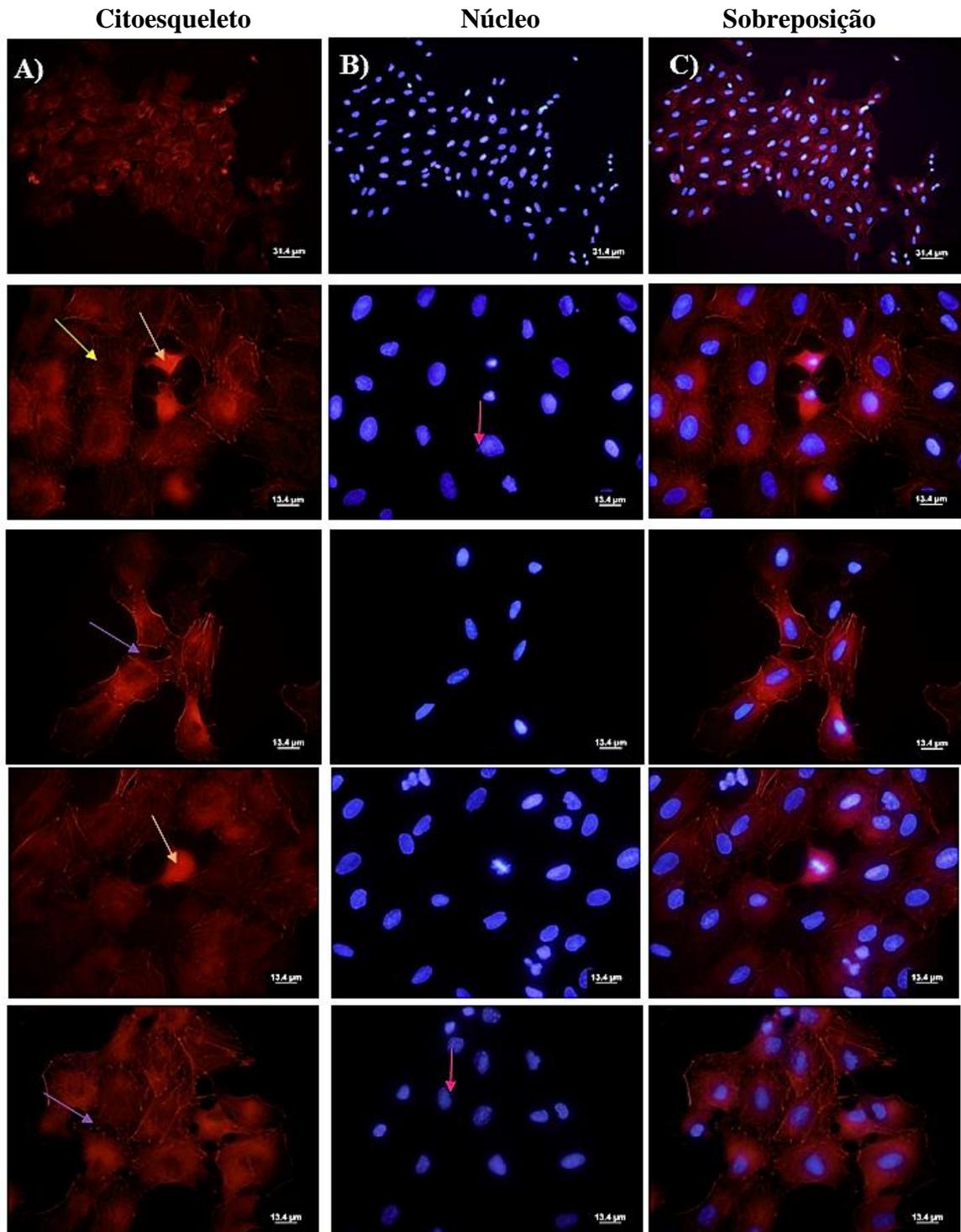
Quanto ao núcleo foi possível observar algumas pequenas alterações em sua morfologia (seta rosa - Figura 15) tais como, surgimento de micronúcleos e deformações, porém essas alterações apresentam-se em quantidade irrelevantes, sugerindo que foram resultantes do próprio estresse metabólico comum a culturas celulares e não devido à ação da Ang-(1-7).

Essas análises também foram realizadas para o grupo 2 de células onde os clones com o plasmídeo pEP-miR Controle foram considerados como controle em comparação aos clones pEP-miR-4465 ou pEP-miR-513a-3p. A Figura 16 apresenta os resultados obtidos para o clone pEP-miR Controle, e as Figuras 17 e 18 mostram os resultados obtidos para os clones pEP-miR-4465 e pEP-miR-513a-3p, respectivamente.

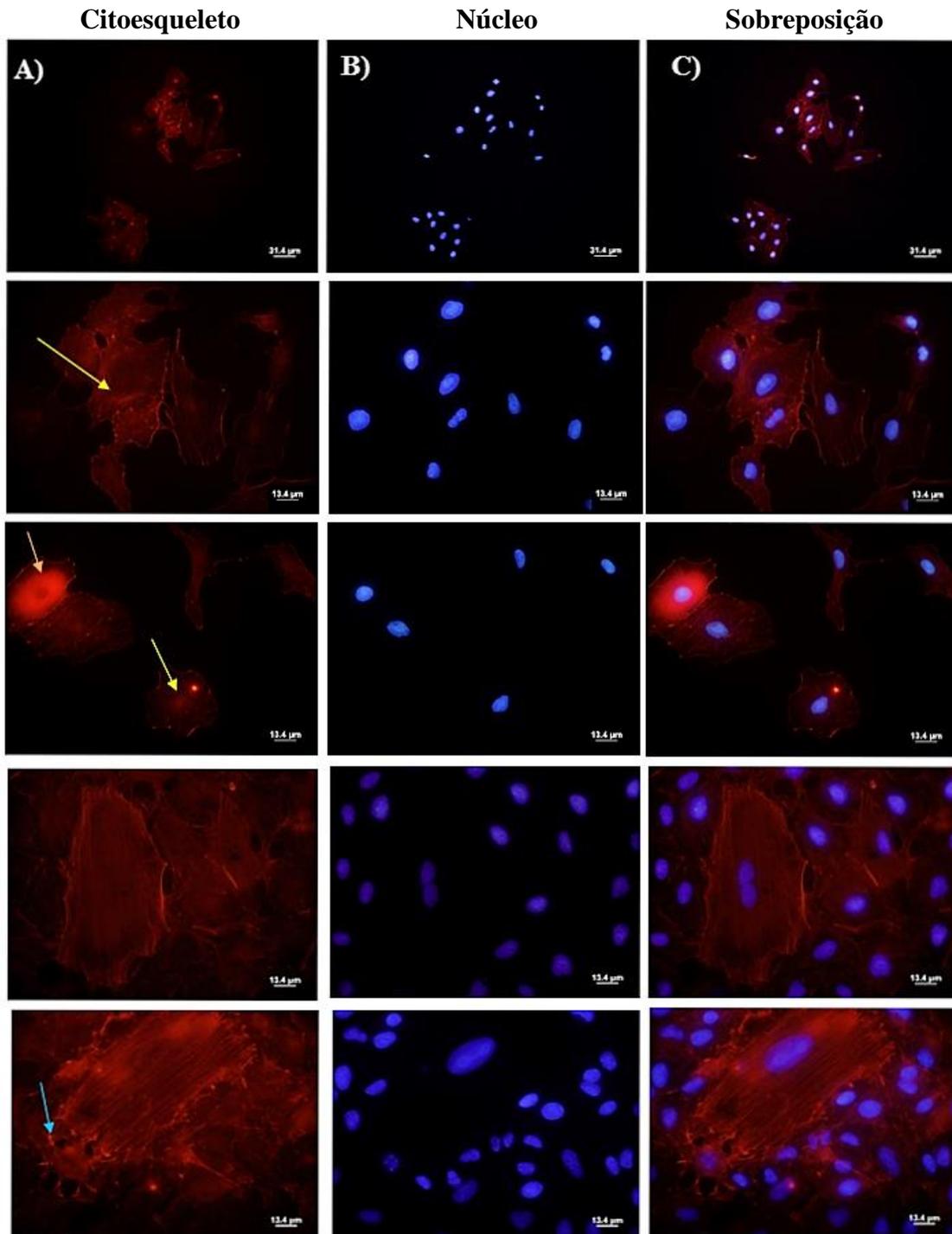
**Figura 16:** Microscopia de fluorescências de clone pEP-miR Controle coradas com Faloidina-TRITC e DAPI. A) Coloração Faloidina-TRITC, citoesqueleto em vermelho; B) Coloração DAPI, núcleo em azul; C) Sobreposição das figuras a e b; Seta amarela: filamentos de actina polimerizados; seta laranja: filamentos de actina despolimerizados; seta azul: ramificações dos filamentos de actina.



**Figura 17:** Microscopia de fluorescências de clone pEP-miR-4465 e coradas com Faloidina-TRITC e DAPI. A) Coloração Faloidina-TRITC, citoesqueleto em vermelho; B) Coloração DAPI, núcleo em azul; C) Sobreposição das figuras a e b; Seta amarela: filamentos de actina polimerizados; seta laranja: filamentos de actina despolimerizados; seta roxa: junções célula a célula; seta rosa: micronúcleo.



**Figura 18:** Microscopia de fluorescências de clone pEP-miR-513a-3p e coradas com Faloidina-TRITC e DAPI. A) Coloração Faloidina-TRITC, citoesqueleto em vermelho; B) Coloração DAPI, núcleo em azul; C) Sobreposição das figuras a e b; Seta amarela: filamentos de actina polimerizados; seta laranja: filamentos de actina despolimerizados; seta azul: ramificações dos filamentos de actina.



As análises morfofisiológicas do citoesqueleto e do núcleo dos clones celulares apresentaram resultados muito interessantes para a discussão sobre os processos de adesão e migração celular. Cada conjunto de células apresentou características singulares.

O clone pEP-miR Controle (Figura 16) não apresentou nenhuma mudança significativa nos núcleos. Já o citoesqueleto apresentou ramificações (seta azul) dos filamentos de actina, além disso, podemos observar uma maior despolimerização do citoesqueleto ao redor da região do núcleo (seta laranja). A polimerização dos filamentos de actina nesse grupo é pouco observada, mas quando ocorre se apresenta de forma difusa com muitos filamentos que se sobrepõem de maneira desordenada entre si. Entretanto, muitas das alterações do citoesqueleto são também observadas nas imagens das células A549 não tratadas com Ang-(1-7) (Figura 14), o que reforça positivamente o papel de nosso clone pEP-miR Controle nos ensaios.

Prosseguindo as análises, para as células do clone contendo o plasmídeo que superexpressam o miRNA hsa-miR-4465 (Figura 17) foram observados padrões de polimerização e despolimerização de filamentos de actina semelhante aqueles observados no clone pEP-miR Controle (Figura 16). Entretanto, a análise das imagens revela que maior é a frequência de filamentos de actina polimerizados, embora as fibrilas sejam menos espessas (seta amarela). Novamente uma despolimerização é observada próxima ao núcleo, principalmente nas células que estão na fase de divisão celular (seta laranja). Ainda sobre o citoesqueleto, esse clone apresentou uma grande quantidade de fibras que interconectam uma célula a outra (seta roxa). Essa junção célula a célula pode indicar que há uma modulação no processo de adesão celular nesse grupo. No núcleo não foram observadas modificações significativas, embora sejam observados a presença de alguns poucos micronúcleos (seta rosa).

A Figura 18 apresenta as análises de microscopia realizadas para os clones miR-513a-3p, que revelou a presença de fibras de actina delgadas e menos espessas que nas encontradas nas células transfectadas com o pEP-miR Controle (seta amarela). Diferentemente dos clones pEP-miR Controle a despolimerização da actina nesse grupo foi pouco observada, mas quando observada se encontrava próximo ao núcleo (seta laranja). Ramificações de fibras de actina também foram observadas (seta azul). Essas ramificações podem ser fibras de estresse que já também evidenciadas para as células do grupo1. Nenhuma modificação significativa no núcleo foi observada.

Em conjunto, as análises de microscopia revelam padrões singulares para cada clone, mas as células que superexpressam os miRNAs apresentam maiores alterações em sua morfologia que o próprio pEP-miR Controle, tanto na montagem dos filamentos de actina,

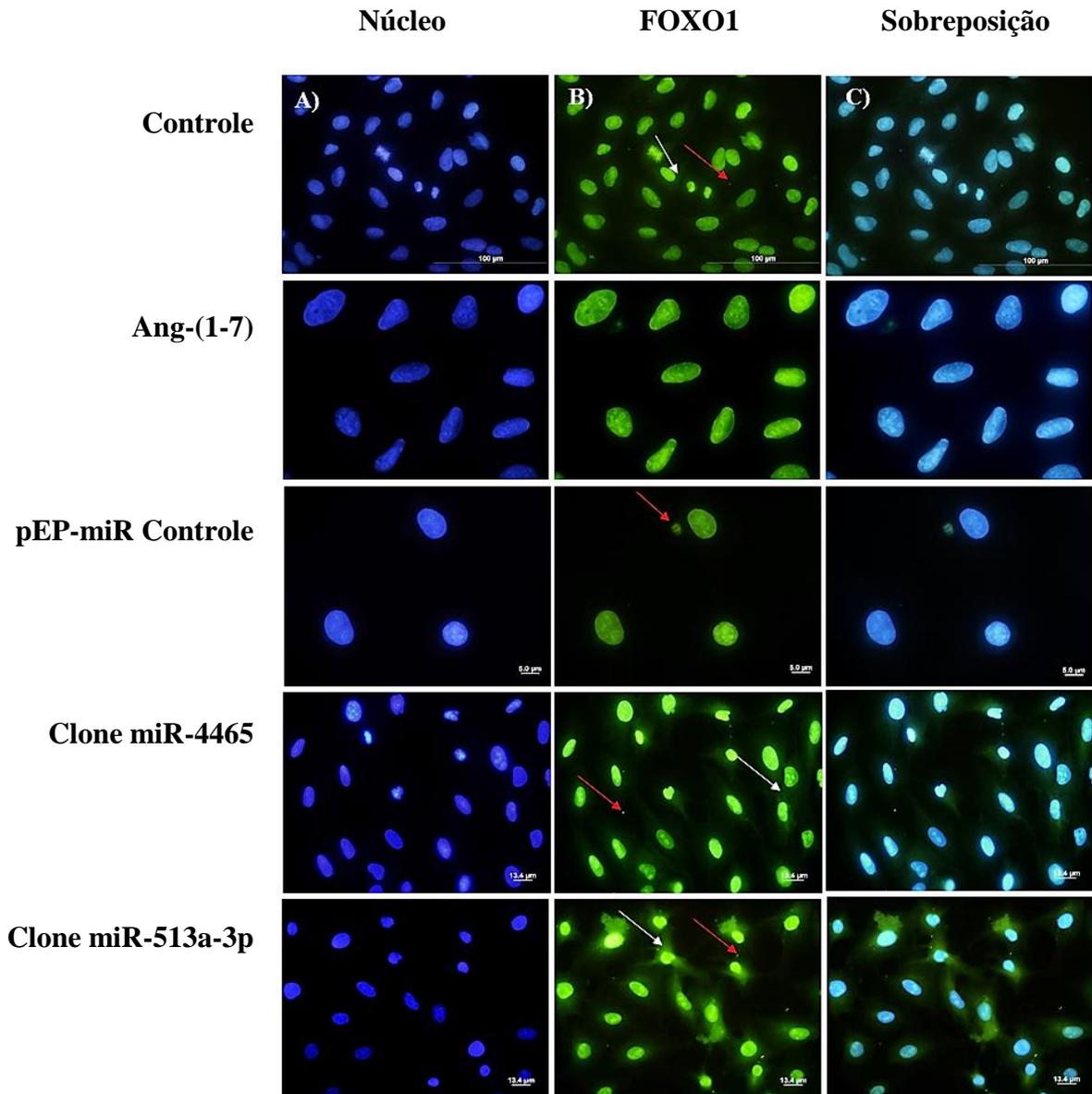
como em sua própria distribuição. Tais alterações são certamente um reflexo da alteração da regulação da expressão gênica que os miRNAs perfazem dentro do equilíbrio sistêmico.

#### **4.6 Imunofluorescência de FOXO**

O fator de transcrição FOXO está envolvido em processos celulares cruciais devido ao seu papel de regulação da expressão de genes que desencadeiam a apoptose e a resistência ao estresse oxidativo (CARTER; BRUNET, 2007). Além disso, acredita-se que FOXO1 possui atividade supressora tumoral (GREER; BRUNET, 2005).

Como já mencionado o mRNA desse fator de transcrição possui sítios prováveis de ligação com os miRNAs investigados nesse trabalho. Nesse contexto, a análise de imunofluorescência foi realizada com o objetivo de melhor compreender como essa molécula se correlaciona com a Ang-(1-7) e os miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p. A Figura 19 apresenta algumas das fotomicrografias obtidas.

**Figura 19:** Microscopia de imunofluorescência de FOXO1 nas células A549 tratadas ou não com Ang-(1-7), nos clones pEP-miR Controle, pEP-miR-4465 e pEP-miR-513a-3p. A) Coloração FITC, localização do FOXO1 em verde; B) Coloração DAPI, núcleo em azul; C) Sobreposição das figuras a e b; Seta branca: disposição do FOXO1 fora do núcleo; seta vermelha: grânulos de FOXO1.



Com as análises foi possível observar diferenças de localização da molécula nas células tratadas e não tratadas (controle) com a Ang-(1-7). No tratamento com o peptídeo Ang-(1-7) FOXO1 localiza-se com mais intensidade no interior do núcleo do que nas células A549 não tratadas, onde o fator de transcrição é por vezes encontrado fora do núcleo (seta branca). Esse resultado pode sugerir a ativação do fator de transcrição pela Ang-(1-7), reafirmando as propriedades antitumorais desse peptídeo. Resultado semelhante foi obtido por

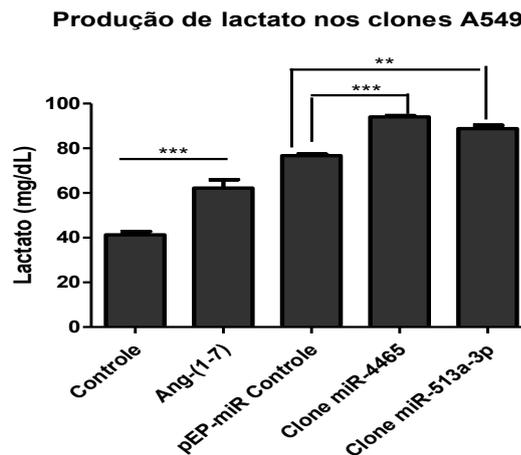
VERANO-BRAGA et al. (2012). Além disso, a aparição de grânulos da molécula (seta vermelha) que podem indicar mecanismos de estresse celular que alteram a homeostasia e são menos observadas nas células tratadas quando em comparação com o controle.

Prosseguindo as análises com o grupo 2, o de cultivo com puromicina, podemos observar diferenças bem evidentes da localização do FOXO1 quando comparamos o pEP-miR Controle com os clones que superexpressam os miRNAs. Enquanto o controle apresenta FOXO1 localizado mais vezes dentro do núcleo, os clones miR-4465 e miR-513a-3p por sua vez apresentam a molécula bem evidenciada fora do núcleo também (seta branca). Grânulos de FOXO1 são mais encontrados nos clones. Essas observações evidenciam como a superexpressão desses miRNAs nas células afetam a homeostasia celular.

#### **4.7 Análises bioquímicas: a produção de lactato e pH**

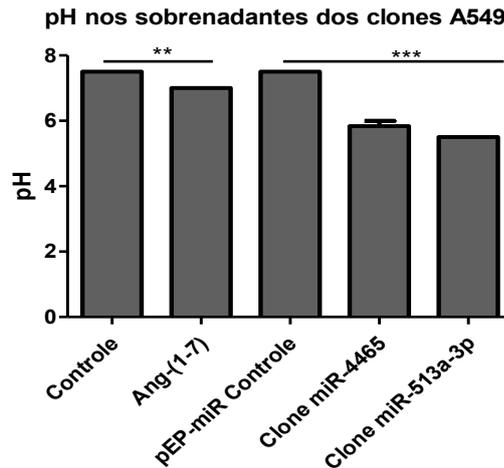
Para se avaliar os possíveis efeitos da Ang-(1-7) e dos miRNAs no metabolismo celular, a produção de lactato pelas células A549 tratadas ou não com  $10^{-7}$  M de Ang-(1-7) e pelos clones celulares foi avaliada. Para isso, os sobrenadantes das culturas de células foram colhidos após 24 horas do início do cultivo ( $T_0$ ) e no intervalo aonde as células atingiram aproximadamente 90% de confluência. Baixos níveis de lactato foram observados no sobrenadante de todas as culturas  $T_0$ , e que é justificado pelo pequeno número de células ( $T_0$ ) (dados não apresentados). Entretanto, a mensuração dos níveis de lactato no sobrenadante das culturas que atingiram ~ 90% de confluência revelaram uma produção exacerbada do metabólito em todas as condições investigadas. Essas alterações metabólicas sugerem a alteração no metabolismo basal celular em relação à utilização de fontes energéticas e o aumento da produção de lactato pelas células tumorais pode estar correlacionada com o efeito Warburg (DEBERARDINIS et al., 2008). Esse efeito se caracteriza pela alteração nas taxas do metabolismo oxidativo de produção energética na via ciclo de Krebs, e uma maior utilização da via anaeróbica (MATOBA et al., 2006; DEBERARDINIS et al., 2008). A Figura 20 apresenta os resultados obtidos para cada uma das condições avaliadas no intervalo em que as culturas celulares atingiram 90% de confluência.

**Figura 20:** Ensaio de mensuração dos níveis de lactato nos sobrenadantes das células A549 tratadas ou não tratadas (controle) com o heptapeptídeo Ang-(1-7) a  $10^{-7}$  M e nos clones pEP-miR Controle, miR-4465 e miR-513a-3p. As análises foram realizadas em triplicatas e o gráfico foi plotado utilizando-se o software Graph Pad Prism 5 com os valores de lactato obtidos quando as culturas atingiram 90% de confluência. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde  $***p < 0.0005$ ,  $**p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$ . O teste de *Dunnett* foi realizado separadamente para o grupo 1, considerando a célula A549 como controle, e grupo 2, considerando a célula transfectada com o plasmídeo pEP-miR Controle como controle.



A análise permitiu observar que há um aumento significativo na produção de lactato entre as células A549 tratadas com Ang-(1-7) em relação às células A549 controle. Aumento significativo na produção de lactato nos clones também ocorreu quando na comparação com o pEP-miR controle. Pressupõe-se que aumento de lactato no microambiente tumoral torne o meio mais ácido, o que module o processo metastático. Para se verificar essa correlação e utilizando-se o mesmo sobrenadante das culturas celulares acima mencionadas o pH foi mensurado (Figura 21). Interessantemente, os resultados apresentam-se dentro dos padrões esperados, com reduções significativas no pH o que refletem as alterações do metabolismo celular e as variações da produção de lactato como observado na Figura 20.

**Figura 21:** Ensaio de mensuração do pH nos sobrenadantes das células A549 tratadas ou não tratadas (controle) com o heptapeptídeo Ang-(1-7) a  $10^{-7}$  M e nos clones pEP-miR Controle, miR-4465 e miR-513a-3p. As análises foram realizadas em triplicatas e o gráfico foi plotado utilizando-se o *software* Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way* ANOVA seguido pelo teste de *Dunnnett*, onde  $***p < 0.0005$ ,  $**p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$ . O teste de *Dunnnett* foi realizado separadamente para o grupo 1, considerando a célula A549 como controle, e grupo 2, considerando a célula transfectada com o plasmídeo pEP-miR Controle como controle.



Como esperado houve queda significativa do pH nas células tratadas com Ang-(1-7) assim como nos clones quando comparadas com seus respectivos controles. As alterações no pH, podem controlar o crescimento tumoral pela redução dos níveis de VCAM (HE et al., 2015). Interessantemente, em nosso modelo, temos a redução do pH (Figura 21) e da expressão de VCAM (Figura 12) nos clones celulares, o que reforça ainda mais o papel pontual de tais miRNAs (hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p) na modulação dos processos de migração e crescimento celular.

Assim, com os resultados obtidos, verificamos que o peptídeo Ang-(1-7) modula sim o ambiente das células, e de maneira intrigante os clones pEP-miR, também o fazem. Embora os diferentes grupos de células sejam mantidos em meios com particularidades específicas, os ensaios deixam claro os efeitos da angiotensina-(1-7) em vários dos processos analisados, assim como os efeitos dos miRNAs, que em certo modo mimetiza alguns dos efeitos do heptapeptídeo.

#### 4.8 Análise do padrão de crescimento e migração das culturas de células

Para melhor se compreender a fisiologia e metabolismo celular, que afetam diretamente o crescimento celular, o tempo de duplicação dos diferentes grupos celulares foi analisado (Tabela 3). Os resultados demonstram que o tempo de duplicação das células A549 aumenta quando tratada com Ang-(1-7) em relação ao controle. Isso sugere que o heptapeptídeo inibe de certa forma o crescimento dessas células.

O aumento também foi observado para os clones na comparação das células transfectadas com os clones pEP-miR-4465 e pEP-miR-513a-3p das células transfectadas com o plasmídeo controle. O aumento no tempo de duplicação das células nesses casos foi alto. Acredita-se ser interessante observar que o aumento no tempo de duplicação das células que superexpressam o miR-513a-3p corresponde a quase o dobro de horas daquelas observadas nas células pEP-miR Controle.

**Tabela 3:** Tempo de duplicação das células A549 tratada ou não com  $10^{-7}$  M de Ang-(1-7), e dos clones celulares pEP-miR Controle, pEP-miR-4465 e pEP-miR-513a-3p. O tempo de duplicação foi calculado através da fórmula:  $DT = t * \ln(2) / \ln(A/A_0)$  (CASTILHO-FERNANDES et al., 2011), onde: DT é o tempo de duplicação, A é o número de células no intervalo t e  $A_0$  é o número de células iniciais.

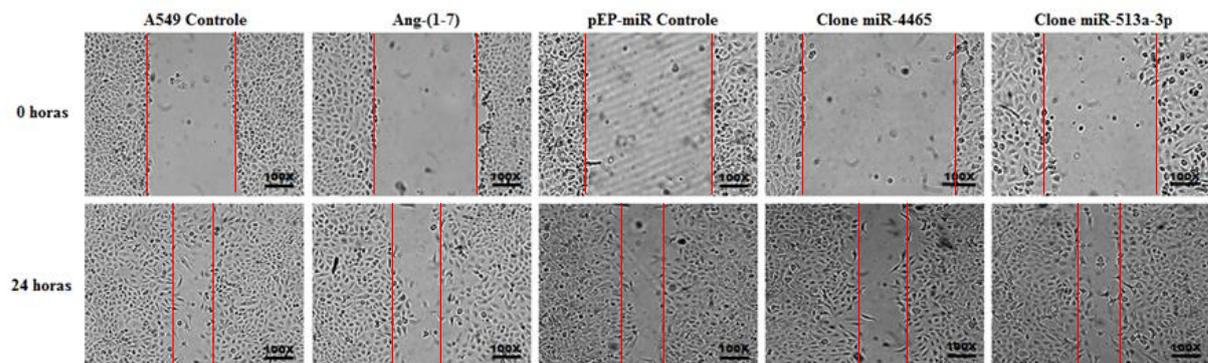
|                            |                       |
|----------------------------|-----------------------|
| A549 Controle              | 18 horas e 10 minutos |
| A549 tratada com Ang-(1-7) | 22 horas e 20 minutos |
| Clone pEP-miR Controle     | 17 horas e 35 minutos |
| Clone miR-4465             | 29 horas 54 minutos   |
| Clone miR-513a-3p          | 32 horas 49 minutos   |

Seguindo as análises, foram realizados ensaios de ferida para se medir o potencial de crescimento e migração dos diferentes grupos de células. O ensaio de ferida é adequado em estudos que analisam os efeitos da interação célula-célula e célula-matriz no processo de migração celular (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Como esse estudo tem o objetivo de analisar o efeito da superexpressão de dois miRNAs no processo de adesão e migração de células esse ensaio é relevante. Após a confluência das culturas e as subsequentes realizações de ranhuras, as feridas nas monocamadas das culturas celulares foram fotografadas após um intervalo de 24 horas (Figura 22A). A área de recuperação da ferida foi quantificada nos intervalos de 0 e 24 h para cada um dos clones separadamente e os resultados obtidos foram convertidos em porcentagem de recuperação da área. Os resultados foram então plotados em

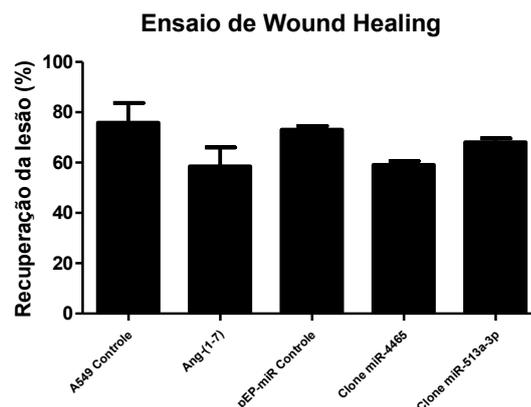
gráfico, que permitiu a análise comparativa dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação das feridas para as células A549 e seus clones (Figura 22B).

**Figura 22:** Ensaio de *Wound Healing* nas culturas de células A549 tratadas ou não (controle) com o heptapeptídeo Ang-(1-7) a  $10^{-7}$  M e nos clones pEP-miR Controle, pEP-miR-4465 e pEP-miR-513a-3p. A regeneração da ferida nos diferentes grupos celulares foi fotografada logo após a ranhura e posterior a um intervalo de 24 horas. Os ensaios foram realizados em triplicatas. A) Fotografias obtidas das culturas celulares imediatamente após a ranhura e após um intervalo de 24 horas. As imagens apresentadas são representativas de um dos ensaios realizados. B) Gráfico representativo da porcentagem de recuperação da área lesionada para cada um dos grupos celulares entre os intervalos de 0 e 24 horas. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnnett*, onde  $***p < 0.0005$ ,  $**p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$ . O teste de *Dunnnett* foi realizado para o grupo 1, considerando a célula A549 como controle, e grupo 2, considerando a célula transfectada com o plasmídeo pEP-miR Controle como controle.

A)



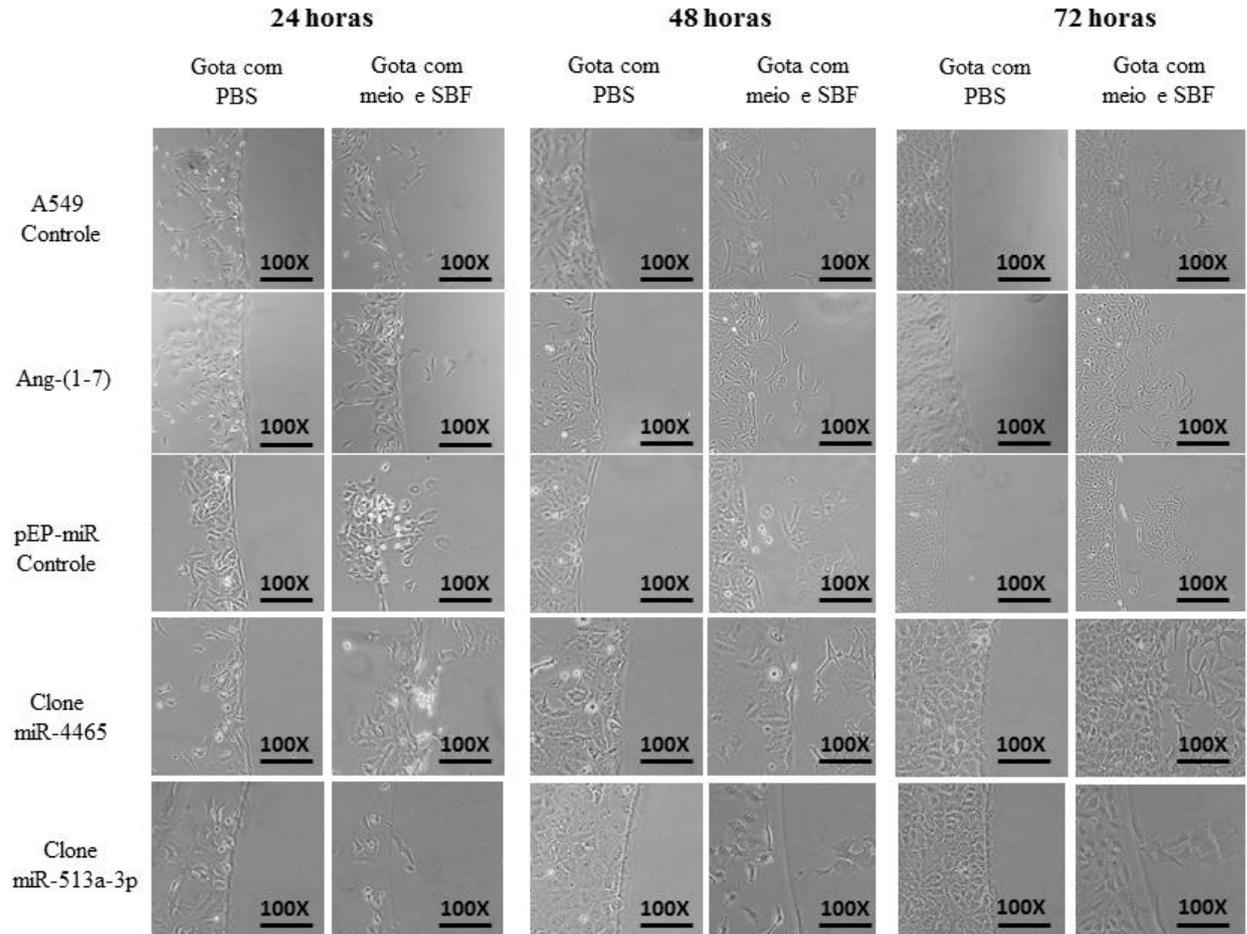
B)



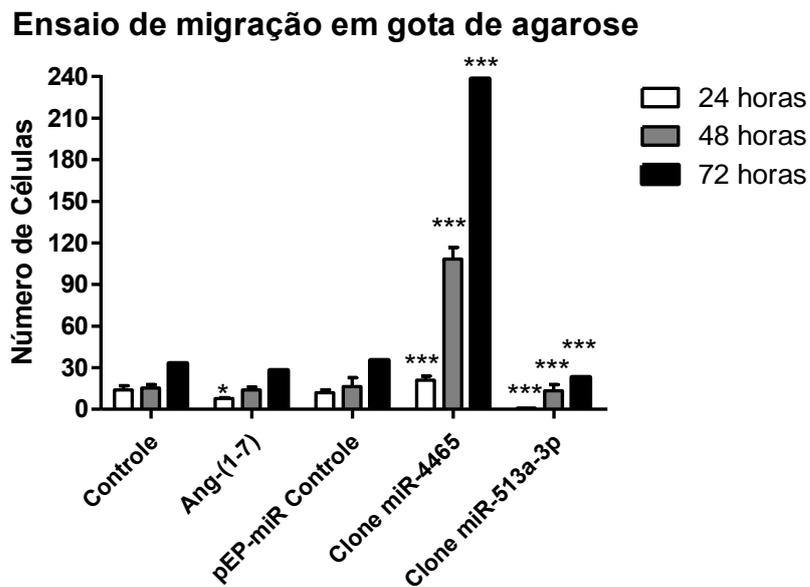
Apesar dos resultados apontarem uma recuperação da lesão na célula tratada com o heptapeptídeo menor do que o observado na célula A549 não tratada, a análise estatística não apontou alterações significativas entre os grupos. A mesma observação foi vista entre os clones pEP-miR no intervalo de 24 horas. Talvez uma análise em intervalos menores (12 horas) revele taxas de recuperação das feridas com significância estatística.

Para uma complementação das análises funcionais do processo de migração e adesão das células e dos efeitos do peptídeo e dos miRNAs investigados, foi realizado o ensaio de *spot* de agarose (WIGGINS; RAPPOPORT, 2010). Com esse ensaio pode-se avaliar as taxas da migração celular, baseando-se na capacidade das células migrarem por uma gota de agarose. Para esse ensaio, as gotas de agarose foram preparadas com solução de PBS (controle negativo) ou meio de cultivo completo contendo SBF. A presença de SBF nas gotas permitiu a migração das células em sua direção, devido a presença de nutrientes e fatores de crescimento no soro, fato não observado nas gotas de agarose preparadas na presença de PBS somente. As análises foram realizadas nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Durante esses intervalos as gotas foram fotografadas e as células que migraram por de baixo da gota foram contadas. Os resultados obtidos são apresentados nas Figura 23 e 24.

**Figura 23:** Ensaio de gotas de agarose nas células A549 tratadas ou não (controle) com o heptapeptídeo Ang-(1-7) a  $10^{-7}$  M e dos clones pEP-miR Controle, pEmiR-4465 e miR-513a-3p. As gotas de agarose foram preparadas com PBS (controle negativo) ou preparadas com meio de cultivo celular contendo SBF. As gotas e as células foram observadas nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Os ensaios foram realizados em triplicatas e as imagens apresentadas são representativas de um dos ensaios.



**Figura 24:** Quantificações do ensaio de *spot* de agarose nas células A549 tratadas ou não (controle) com o heptapeptídeo Ang-(1-7) a  $10^{-7}$  M e dos clones pEP-miR Controle, pEP-miR-4465 e pEP-miR-513a-3p. As gotas de agarose foram preparadas com meio completo e as células que migrarem por de baixo da gota foram contadas. As gotas e as células foram observadas nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. O gráfico foi plotado utilizando-se o *software* Graph Pad Prism 5. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnett*, onde \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ . O teste de *Dunnett* foi realizado separadamente para o grupo 1, considerando a célula A549 como controle, e grupo 2, considerando as células transfectadas com o plasmídeo pEP-miR Controle como controle.



Pelas análises observamos mais uma vez o efeito modulador do peptídeo Ang-(1-7) no processo de migração celular. Para se garantir o efeito fisiológico do heptapeptídeo, o meio de cultura contendo a Ang-(1-7) das culturas celulares em análise foi substituído em intervalos regulares de 24 horas. Os resultados apontam que apenas nas primeiras 24 horas de cultivo, as células tratadas com Ang-(1-7) apresentaram menor migração que as células controle, o que não foi observado nos intervalos subsequentes. Podemos sugerir que no ambiente celular esse peptídeo modula em primeira instância a migração celular, mas a sua presença sozinha não é a suficiente para mudar rigorosamente tal processo em cultura de células. Provavelmente mecanismos correlatos da sinalização celular atuam de maneira a reestabelecer as taxas de crescimento celular. Essa observação é reforçada pelas análises do tempo de duplicação apresentados na Tabela 3 (DT-A549 = ~18 h; DT- A549 tratadas com Ang-(1-7) = ~22 h). Certamente, muito ainda há para se desvendar sobre os mecanismos de ação desse peptídeo.

Prosseguindo a discussão, quando das análises do perfil de migração dos clones observa-se que o clone pEP-miR-4465 demonstra a maior capacidade migratória e invasora, chegando a dobrar o número de células por baixo da gota a cada 24 horas, diferente do observado no ensaio da ferida. Entretanto, como observado nas análises morfofisiológicas (Figura 17), as células que superexpressam esse miRNA apresentam grande interação célula a célula através das evidenciadas junções de filamentos de actina, o que sugere uma forte quimiotaxia das células. Essa característica de forte adesão celular pode explicar, de certo modo, porque a migração dessas células foi maior que dos outros grupos celulares.

Por outro lado, temos o clone miR-513a-3p. Esse clone apresentou a menor capacidade migratória e invasora dentre os clones celulares. Além de uma possível modulação na migração celular, esse resultado se relaciona com o crescimento mais lento devido ao tempo de duplicação alto que foi encontrado para esse clone ( $DT = \sim 32$  h, Tabela 3). Podemos sugerir que esse miRNA, assim como o hsa-miR-4465 estão relacionados com o processo de migração, porém de maneiras opostas.

## 5. CONCLUSÕES

O câncer de pulmão é ainda considerado um sério problema de saúde pública e estudos epidemiológicos mais recentes reportam que no Brasil, no ano de 2014, 27330 novos casos de cânceres de pulmão foram diagnosticados (INCA, 2015). Assim, considerando-se a necessidade de inovações terapêuticas para o controle dessa epidemia, o peptídeo vasoativo se desponta em alguns estudos preliminares (GALLAGHER et al., 2011). Dentro desse contexto, investigamos os miRNAs hsa-miR-4465 e hsa-miR-513a-3p, considerando-se que o peptídeo vasoativo modula positivamente a expressão dessas moléculas. Como reportado anteriormente, esses miRNAs possuem sítios prováveis de ligação nos genes de adesão, e por isso norteamos nossas análises na compreensão de alguns aspectos correlacionados ao fenômeno da adesão e migração celular. A superexpressão pontual desses miRNAs nas células A549, viabilizou um estudo comparativo do comportamento celular na condição investigada, com o efeito sistêmico da Ang-(1-7).

Com os resultados alcançados podemos ver que tanto o miRNA hsa-miR-4465 quanto o hsa-miR-513a-3p estão envolvidos com os processos de adesão, migração e crescimento nas células A549 estudadas. Esses miRNAs quando superexpressados ocasionaram alterações morfofuncionais nas células, tanto pela alteração da expressão de genes de adesão e migração, como pelo comportamento celular, que são em conjunto diferentes dos resultados obtidos para as células A549 tratadas ou não com a Ang-(1-7).

Particularmente, a análise dos clones que superexpressaram o miR-4465 apontou alguns resultados muito interessantes: considerável número de filamentos de actina representando interação célula a célula, aumento da expressão do gene *COL1A1* e alta capacidade de migração celular. Sabemos, que essa última característica pode favorecer o processo metastático e a própria evolução do tumor. Paralelamente, foi observado que a expressão de *COL1A1* se correlaciona com a agressividade de tumores em alguns estudos (BARKAN et al., 2010). De maneira conjunta, a superexpressão do miRNA hsa-miR-4465 não pode ser considerada como um elemento promissor ao desenvolvimento de terapias que controlem o crescimento tumoral, mas podemos considerá-lo como um marcador molecular da agressividade tumoral. Quando da análise dos mesmos elementos acima nas células A549 tratadas ou não com o peptídeo, observamos que na presença da Ang-(1-7), temos também um aumento da expressão do gene *COL1A1*, mas as taxas de migração são menores, devido ao efeito sistêmico do heptapeptídeo no controle da migração e crescimento tumoral.

Já, os resultados obtidos com a análise do hsa-miR-513a-3p apontam que esse miRNA se comporta de maneira diferente daquela observada pelo miR-4465. Quando superexpresso esse miRNA diminuí consideravelmente o crescimento das células (DT), além de diminuir sua capacidade migratória. A diminuição na expressão do gene *ITGB8* também foi um resultado relevante em nossas análises. Essa molécula possui importante função na adesão célula a célula e nas interações da célula à MEC, além de regular a migração, a diferenciação e a proliferação celular em tecidos de células normais ou tumorais (HYNES, 2002; SPEICHER et al., 2014), sendo que a diminuição na sua expressão contribui negativamente com o processo metastático (XU et al., 2012). Interessantemente, as células A549 tratadas com o hepatpeptídeo também apresentaram uma baixa expressão do gene *ITGB8* e uma redução do crescimento da célula tumoral. Em conjunto podemos considerar como promissora um futuro detalhamento funcional dos mecanismos de ação do hsa-miR-513a-3p no controle do processo de crescimento tumoral.

Resumidamente, os miRNAs são importantes alvos terapêuticos devido a sua fina função de controle da expressão gênica nas células. Os miRNAs estudados nesse trabalho demonstraram ser interessantes alvos de estudo de processos que envolvem células tumorais, potencialmente subsidiando, em longo prazo, o desenvolvimento de novos fármacos.

## 6. REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, V.; BAL, M. Strategies for rapid production of therapeutic proteins in mammalian cells. **Bioprocess Int**, v. 10, n. 4, p. 32-46, 2012.
- AUSUBEL, F. M. (Ed.). **Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. 1 (2002)**. Wiley, 2002.
- BARCELLOS, K. S. A. et al. ARHGAP21 protein, a new partner of  $\alpha$ -Tubulin involved in cell-cell adhesion formation and essential for epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 4, p. 2179-2189, 2013.
- BARKAN, D. et al. Metastatic growth from dormant cells induced by a col-I-enriched fibrotic environment. **Cancer Research**, v. 70, n. 14, p. 5706-5716, 2010.
- BEAVON, I. R. G. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 13, p. 1607-1620, 2000.
- BOGUSLAWSKA, J. et al. Expression of genes involved in cellular adhesion and ECM-remodelling correlates with poor survival of renal cancer patients. **The Journal of Urology**, 2015.
- CAO, R. et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 604-613, 2003.
- CASTILHO-FERNANDES, A. et al. Human hepatic stellate cell line (LX-2) exhibits characteristics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 91, n. 3, p. 664-672, 2011.
- CRUZ, M. et al. Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)**, v. 15, n. 4, p. 669-682, 2009.
- DEBERARDINIS, R. J. et al. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 18, n. 1, p. 54-61, 2008.
- ESAU, C. C.; MONIA, B. P. Therapeutic potential for microRNAs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 2, p. 101-114, 2007.

- ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 4, p. 259-269, 2006.
- FRIEDL, P.; ALEXANDER, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 992-1009, 2011.
- FURUSE, M.; TSUKITA, S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 4, p. 181-188, 2006.
- FUTREAL, P. A. et al. A census of human cancer genes. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 3, p. 177-183, 2004.
- GALLAGHER, P. E. et al. Angiotensin peptides and lung cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 11, n. 4, p. 394, 2011.
- GASTL, G. et al. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. **The Lancet**, v. 356, n. 9246, p. 1981-1982, 2000.
- GAVARD, J.; GUTKIND, J. S. VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 8, p. 883-885, 2008.
- GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v. 285, n. 5430, p. 1028-1033, 1999.
- GLYNN, S. A. et al. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells. **BMC Cancer**, v. 8, n. 1, p. 1, 2008.
- GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.
- HAYES, J.; PERUZZI, P. P.; LAWLER, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 8, p. 460-469, 2014.
- HE, X. et al. pH-Responsive Wormlike Micelles with Sequential Metastasis Targeting Inhibit Lung Metastasis of Breast Cancer. **Advanced Healthcare Materials**, 2015.
- HE, W. et al. Aberrant methylation and loss of CADM2 tumor suppressor expression is associated with human renal cell carcinoma tumor progression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 435, n. 4, p. 526-532, 2013.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 673-687, 2002.

Instituto Nacional de Câncer “José Alencar Gomes da Silva” – INCA, disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. acesso em 30 jul.2015.

KÜMPER, S.; RIDLEY, A. J. p120ctn and P-cadherin but not E-cadherin regulate cell motility and invasion of DU145 prostate cancer cells. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11801, 2010.

LAU, P. P.; CHAN, L. Involvement of a chaperone regulator, Bcl2-associated athanogene-4, in apolipoprotein B mRNA editing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 52, p. 52988-52996, 2003.

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

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

LIN, Y. L. et al. Clinical significance of protocadherin 8 (PCDH8) promoter methylation in non-muscle invasive bladder cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 33, n. 1, p. 1, 2014.

LINDNER, V. et al. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. **Circulation Research**, v. 68, n. 1, p. 106-113, 1991.

LU, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 834-838, 2005.

MALIK, G. et al. Plasma fibronectin promotes lung metastasis by contributions to fibrin clots and tumor cell invasion. **Cancer Research**, v. 70, n. 11, p. 4327-4334, 2010.

MATOBA, S. et al. p53 regulates mitochondrial respiration. **Science**, v. 312, n. 5780, p. 1650-1653, 2006.

MENDELL, J. T.; OLSON, E. N. MicroRNAs in stress signaling and human disease. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1172-1187, 2012.

MENON, J. et al. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice through a reduction in cyclooxygenase-2. **Cancer Research**, v. 67, n. 6, p. 2809-2815, 2007.

MORRIS, M. R. et al. Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. **Oncogene**, v. 30, n. 12, p. 1390-1401, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MÜNZ, M. et al. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. **Oncogene**, v. 23, n. 34, p. 5748-5758, 2004.

Organização Mundial de Saúde, disponível em: <http://www.who.int/en/>, acessado em 06/07/2014.

Online Mendelian Inheritance in Man, disponível em: <http://omim.org/entry/158000#description>, acessado em 28/12/2015.

PATRIARCA, C. et al. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 1, p. 68-75, 2012.

PERL, A. K. et al. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. **Nature**, v. 392, n. 6672, p. 190-193, 1998.

ROSE, D. M.; HAN, J.; GINSBERG, M. H.  $\alpha 4$  integrins and the immune response. **Immunological Reviews**, v. 186, n. 1, p. 118-124, 2002.

SAMBROOK, J.; GREEN, M.R. **Molecular Cloning, a Laboratory Manual**, 4ed. Cold Spring Harbor Press, New York, p. 2028, 2012.

SANTARIUS, T. et al. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 1, p. 59-64, 2010.

SOTO-PANTOJA, D. R. et al. Angiotensin-(1-7) inhibits tumor angiogenesis in human lung cancer xenografts with a reduction in vascular endothelial growth factor. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 6, p. 1676-1683, 2009.

- SUYAMA, K. et al. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. **Cancer Cell**, v. 2, n. 4, p. 301-314, 2002.
- SPEICHER, T. et al. Knockdown and knockout of  $\beta$ 1-integrin in hepatocytes impairs liver regeneration through inhibition of growth factor signalling. **Nature Communications**, v. 5, 2014.
- STOLETOV, K. et al. Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 13, p. 2332-2341, 2010
- TAI, K. Y. et al. DNA methylation and histone modification regulate silencing of epithelial cell adhesion molecule for tumor invasion and progression. **Oncogene**, v. 26, n. 27, p. 3989-3997, 2007.
- TAKAHASHI, S. et al. Neural cell adhesion molecule 2 as a target molecule for prostate and breast cancer gene therapy. **Cancer Science**, v. 102, n. 4, p. 808-814, 2011.
- TOJKANDER, S.; GATEVA, G.; LAPPALAINEN, P. Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 8, p. 1855-1864, 2012.
- TONG, A. W.; NEMUNAITIS, J. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? **Cancer Gene Therapy**, v. 15, n. 6, p. 341-355, 2008.
- VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275-292, 2011.
- VELLONEN, K. S. et al. A critical assessment of in vitro tissue models for ADME and drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 94-114, 2014.
- VERANO-BRAGA, T. et al. Time-resolved quantitative phosphoproteomics: new insights into angiotensin-(1–7) signaling networks in human endothelial cells. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 6, p. 3370-3381, 2012.
- XU, Z.; WU, R. Alteration in metastasis potential and gene expression in human lung cancer cell lines by ITGB8 silencing. **The Anatomical Record**, v. 295, n. 9, p. 1446-1454, 2012.
- XU, M. et al. Expression of epithelial cell adhesion molecule associated with elevated ductular reactions in hepatocellular carcinoma. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 38, n. 6, p. 699-705, 2014.
- WHO, Fact sheet cancer em [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). 2012.

WIGGINS, H.; RAPPOPORT, J. An agarose spot assay for chemotactic invasion. **Biotechniques**, v. 48, n. 2, p. 120-123, 2010.

YOUNG, S. A. et al. Integrin  $\alpha 4$  Enhances Metastasis and May Be Associated with Poor Prognosis in MYCN low Neuroblastoma. **PloS One**, v. 10, n. 5, p. e0120815, 2015.

ZHANG, X. et al. miR-513a-3p sensitizes human lung adenocarcinoma cells to chemotherapy by targeting GSTP1. **Lung Cancer**, v. 77, n. 3, p. 488-494, 2012.

MARINA BONFOGO DA SILVEIRA

PEQUENOS RNAS NÃO DECODIFICADORES E SUA RELAÇÃO COM  
MOLÉCULAS DE ADESÃO E MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS  
DE CARCINOMA PULMONAR HUMANO

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karen Cristiane Martinez de Moraes (Orientadora).  
Departamento de Biologia – UNESP Rio Claro

---

Marina Bonfogo da Silveira (Aluna).  
UNESP Rio Claro

Rio Claro, SP \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.