

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação dos fatores indutores da transição epitélio-mesenquimal
(EMT) na biologia das células endoteliais**

Mariana Tomazini Pinto

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação dos fatores indutores da transição epitélio-mesenquimal
(EMT) na biologia das células endoteliais**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Mariana Tomazini Pinto

Orientadora: Profa. Dra. Simone Kashima Haddad

Ribeirão Preto
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

PINTO, Mariana Tomazini

Avaliação dos fatores indutores da transição epitélio-mesenquimal (EMT) na biologia das células endoteliais. Ribeirão Preto, 2015.
141 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Haddad, Simone Kashima

1. EMT. 2. EndMT. 3. Fator de transcrição. 4. TGF- β 2

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Mariana Tomazini Pinto

Título do trabalho: Avaliação dos fatores indutores da transição epitélio-mesenquimal (EMT) na biologia das células endoteliais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para Obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Simone Kashima Haddad

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho:

A Deus, meu amor maior;

Aos meus pais Sonia e Pedro e à minha irmã Marília, pelo amor eterno;

À minha amada afilhada Maria Luíza, por tornar meus dias mais felizes.

Ao meu marido André Luís Ferreira, pelo apoio incondicional.

Agradecimentos

Sempre achei esta a pior parte da tese para escrever, talvez porque seja difícil expressar em poucas palavras a significância de cada pessoa durante a trajetória desse trabalho.

*Gostaria de agradecer primeiramente a **Deus**, pois Ele sempre está ao meu lado e conduz meus caminhos para a vitória. E por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos. A Ele, honra e glória!*

*À **Nossa Senhora**, minha mãezinha do céu, por me ouvir, falar ao meu coração e ser minha intercessora junto a Deus.*

*Agradeço imensamente àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente e que acreditaram mais em mim, do que eu mesma: **minha família**.*

*Ao meu **pai Pedro**, por sempre me apoiar nas minhas decisões.*

*À minha **mãe Sonia**, por ser assim como você é, indescritível, especial, meu espelho e meu exemplo. A mãe que todo mundo queria ter. Obrigada mãe, por ter me proporcionado condições de chegar até aqui, por não medir esforços em me ajudar e principalmente por todo amor, carinho e atenção. Amo muito.*

*Agradeço a minha **irmã Marília**, por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida e por ser a melhor amiga e a melhor irmã que eu poderia ter. Obrigada **Má e Thi** pelo meu maior presente, **Maria Luíza**, a alegria da minha vida.*

*Igualmente, obrigada ao meu **marido André Luís Ferreira**, meu companheiro, meu escudo e minha Coisa. Obrigada por sempre me apoiar, incentivar e fazer de mim a mulher mais completa. Obrigada pela paciência e compreensão nos longos finais de semana de trabalho. Obrigada por acreditar que eu era capaz de fazer os meus experimentos darem certo e por nunca me permitir desanimar, afinal como você diz: “Quem bambeia é barbante”.*

*Agradeço a minha querida orientadora **Prof^a Dr^a Simone Kashima Haddad**. O que posso dizer? Talvez a melhor palavra a se dizer seja GRATIDÃO. Gratidão por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa e ter me orientado desde a minha Iniciação Científica. Gratidão pelos inúmeros ensinamentos e pela oportunidade de crescer cientificamente. Gratidão pela amizade e carinho.*

*Aos meus amigos e companheiros do **Laboratório de Biologia Molecular**: Alexander Ferreira, Aline F. Ferreira, Aline C. Romagnoli, Daiane dos Santos, Evandra S. Rodrigues, Fernanda U. F. Mello, Isabela G. Gyuricza, Kátia K. Otaguiri, Lucas F. Catelli, Pâmela Tinti, Péricles N. M. da Costa, Stetoslav N. Slavov, Suellen G. Salustiano, Talitha B. Cuter e Vanessa Colnaghi. Agradeço pelos momentos de alegria e descontração e principalmente por não medirem esforços em me ajudar. Agradeço em especial a Fernanda, Evandra e Tathiane pelo auxílio e colaboração. Vocês foram essenciais e imprescindíveis.*

E por todos aqueles que um dia fizeram parte do laboratório e contribuíram para os meus conhecimentos: Bruno C. Trindade, Larissa D.F. Nicolete, Maria Fernanda C. Amarante, Mayra D. de Macedo, Maurício C. R. Júnior, Rochele A. França, Rodrigo Haddad e Virgínia M. D. Wagatsuma.

À pesquisadora **Claudia Rodrigues** da Universidade de Miami por todo apoio científico, por me acolher em seu laboratório e me ensinar a fazer pesquisa. Obrigada pela disposição e amizade.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela bolsa de doutorado que me foi concedida.

Ao **Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas**, pela viabilização de todos os experimentos realizados na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

À seção de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, **Henrique Theodoro** e **Rosana Florêncio**, pela competência, disponibilidade e auxílio.

Agradeço ao **Laboratório de Bioinformática** do Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial, a **Jessica Rodrigues Praça**, pelas análises dos dados gerados neste trabalho. Obrigada pela paciência e dedicação.

Ao **Laboratório de Citometria de Fluxo** do Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial à **Patrícia Vianna Bonini Palma** pela paciência e competência na realização dos ensaios. E à **Camila Cristina de Oliveira Menezes** pelo auxílio e disponibilidade.

Ao **Laboratório de Terapia Celular** do Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial a **Dra. Maristela Delgado Orellana**. Obrigada pelos ensinamentos.

Ao **Laboratório de Transferência Gênica** do Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial ao **Lucas Eduardo Botelho** e **Ricardo Bonfim** pelas discussões científicas.

Ao **Centro de Química de Proteínas**, principalmente à **Dra. Carolina Thomé**, **Dra. Clarice Izumi** e **Dr. Germano Ferreira**, pelo auxílio nos ensaios de Western blot.

Ao **Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)**, em especial ao **Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara** e a **Dra. Clarice Origassa**, pela colaboração, discussão científica e por cederem gentilmente alguns anticorpos utilizados neste trabalho.

A todos os **colegas e funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto**, pela convivência e por fazerem muito por mim e pelo meu trabalho.

Ao **Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci** e **Amélia Araújo** pelo apoio e confecção das bibliotecas de microarrays.

À **Fernanda Udinal** e **Alessandra Almeida** pela assessoria no inglês e no espanhol.

À **Sandra Navarro**, pela paciência, profissionalismo e contribuição na arte gráfica.

Às secretárias **Carmen Cecília de Oliva Simão, Dalva Tereza Catto, Renata Kurukava e Renata Maria Zequim Bertollazzi** pelo carinho e disponibilidade.

À **Dra. Danielle Magalhães, Josiane Serrano e Elaine Teresinha** pelo auxílio e disposição em me ajudar.

Às minhas **eternas amigas**: Adriana, Bianca, Bruna, Camila, Fernanda, Gabriela, Lívia, Karla, Marina, Marcela, Marcella, Paula, Polly, Tássia, Tatiana D., Tatiana M., Thaís e todas as minhas amigas de Bebedouro. Obrigada pela amizade, por estarem sempre ao meu lado e torcerem por mim.

À minha tia, **Hermínia**, e à minha avó, **Palmira**. Obrigada pelo apoio, incentivo e oração.

Aos meus sogros, **Olímpio e Célia**, por sempre me acolherem.

Aos meus amigos de fé **Alex Passos e Irmão Cirineu**. Agradeço por todo carinho, atenção e pelas orações preciosas.

À todos os servos do **Grupo de Oração Filhos da Luz**, pela intercessão e incentivo.

A todos, o meu sincero **Muito Obrigada!** Gratidão, eterna gratidão!

"Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer. "

Amyr Klink

RESUMO

PINTO, M. T. **Avaliação dos fatores indutores da transição epitélio-mesenquimal (EMT) na biologia das células endoteliais.** 2015. 141f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A transição endotélio-mesenquimal (EndMT) é uma forma especializada da transição epitélio-mesenquimal (EMT) e é caracterizada pela alteração da morfologia celular para um formato fibroblastoide, perda da expressão dos marcadores endoteliais e ganho da expressão dos marcadores mesenquimais, bem como a aquisição de propriedades invasivas e migratórias. Entretanto, o mecanismo molecular envolvido nesse processo ainda não está totalmente elucidado. O objetivo desse trabalho foi avaliar os fatores indutores da EMT em células endoteliais (CEs) de fontes distintas por meio da superexpressão do fator de transcrição *SNAIL* e do tratamento com TGF- β 2, bem como identificar os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo. Para tal, as linhagens de CE da artéria pulmonar (HPAEC), pool de CE primária de veia de cordão umbilical (PHUVEC), CE da aorta (PAEC) e CE da artéria coronária (CAEC) foram induzidas em três condições distintas: I) TGF- β 2; II) superexpressão do fator de transcrição *SNAIL*; III) superexpressão do fator de transcrição *SNAIL* associado ao tratamento com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2). Após a indução, a expressão dos genes relacionados com a EndMT foi analisada por PCR em tempo real (qPCR) e as CAECs foram as células que apresentaram maior mudança no perfil de expressão gênica, no qual o grupo *SNAIL*+TGF- β 2 apresentou um aumento dos marcadores mesenquimal *FNI*, *SM22*, *CNN1* e *CD90*. O grupo *SNAIL*+TGF- β 2 também mostrou uma diminuição dos marcadores endoteliais CD31 e CDH5 por *Western blot*. Em seguida, a técnica de *microarray* foi realizada nas CAECs induzidas à EndMT e as análises revelaram um dendrograma cujo perfil mostrou que *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2 se agrupam separadamente das outras condições. Os dados de *microarray* resultaram em uma rede na qual os genes mesenquimais *COL1A1*, *COL1A2*, *FNI* e *CNN1* estavam aumentados no grupo *SNAIL*+TGF- β 2 comparado com o grupo controle. Os genes diferencialmente expressos entre a análise CT vs. *SNAIL*+TGF- β 2 foram analisados quanto a participação em vias canônicas e a via de regulação da EMT foi uma das mais representadas, a qual inclui a via de sinalização Notch e Wnt. Nos dados de *microarray*, *NOTCH3* e *WNT5B* estavam superexpressos no grupo *SNAIL*+TGF- β 2 comparado com o controle. Sabendo que Wnt5b pode inibir a via β -catenina, a expressão de *NOTCH3*, *WNT5B* e β -*CATENINA* foi avaliada por qPCR e a expressão de *NOTCH3* e *WNT5B* confirmou os dados do *microarray* e nenhuma diferença estatística foi observada na expressão de β -*CATENINA*. Ainda, as CAECs induzidas foram submetidas ao ensaio de migração e de capacidade de formação de estruturas semelhantes a capilares. Foi observado que as CAEC-*SNAIL*+TGF- β 2 migraram significativamente comparadas com as outras condições e nenhuma das células induzidas (TGF- β 2, *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2) foram capazes de formar estruturas semelhantes a capilares. Alguns microRNAs foram selecionados e avaliados por qPCR. O miR-let7a foi significativamente expresso no grupo *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2. O ensaio de perda e ganho de função do miR-let7a foi realizado, entretanto, a repressão ou a indução do miR-let7a não alterou a EndMT. Esses resultados sugerem que as CEs de fontes anatômicas distintas apresentam respostas diferentes quando estimuladas a sofrerem EndMT. Ademais, a associação entre *SNAIL*+TGF- β 2 é um potente indutor para EndMT e essa indução pode ser mediada pelas vias de sinalização Notch e Wnt não canônica.

Palavras-chave: EMT, EndMT, fator de transcrição, TGF- β 2.

ABSTRACT

PINTO, M. T. **Evaluation of inducing factors of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the endothelial cells biology.** 2015. 141f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Endothelial-mesenchymal transition (EndMT) is a specialized form of epithelial-mesenchymal transition (EMT) which is characterized by changes in cell morphology as a fibroblastoid conversion, expression of endothelial markers decreased, expression of mesenchymal markers increased and acquirement of invasive and migratory properties. However, the molecular mechanism associated with this process is not completely elucidated. The aim of this study was to evaluate the EMT-inducing factors in the endothelial cells (ECs) from different sources through the overexpression of the transcription factor *SNAIL* and through the treatment with TGF- β 2, as well as to identify the molecular mechanisms involved in EndMT. For this purpose, primary pulmonary artery EC (HPAEC), primary pooled umbilical vein EC (PHUVEC), primary aortic EC (PAEC), primary coronary artery EC (CAEC) lineages were induced under three distinct conditions: I) TGF- β 2; II) ectopic expression of *SNAIL*; III) ectopic expression of *SNAIL* associated with TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2). After the EndMT induction, the expression of the genes associated with EndMT was analyzed by Real time PCR (qPCR) and CAECs showed the most prominent alterations on their gene expression profile which showed that *SNAIL*+TGF- β 2 group presented an increase of mesenchymal markers *FNI*, *SM22*, *CNN1*, and *CD90* expression. CAEC-*SNAIL*+TGF- β 2 group also showed a decrease of endothelial markers CD31 and CDH5 by western blot. Then, microarray was performed in CAECs after EndMT induction and hierarchical clustering analysis showed that the ectopic expression of *SNAIL* and *SNAIL*+TGF- β 2 clustered separately from the other conditions. Microarray data resulted in a network which presented an upregulation of the mesenchymal genes such as *COL1A1*, *COL1A2*, *FNI*, and *CNN1* in the CAEC-*SNAIL*+TGF- β 2 compared to control cells. We analyzed the canonical pathways related to the differentially regulated genes between CAEC- *SNAIL*+TGF- β 2 and control cells and the regulation of EMT pathways was the most represented, which includes Notch and Wnt signaling pathway. In the microarray data, *NOTCH3* and *WNT5B* were overexpressed in CAEC-*SNAIL*+TGF- β 2 compared to control. It is known that Wnt5b might inhibit the β -catenin pathway. Therefore, *NOTCH3*, *WNT5B* and β -*CATENIN* gene expression were analyzed by qPCR. *NOTCH3* and *WNT5B* gene expression confirmed the microarray data and no statistical difference were observed in β -*CATENIN* expression. Moreover, all the CAECs conditions were subjected to scratch migration assay and the formation of capillary-like structures assay. CAEC-*SNAIL*+TGF- β 2 had a significant migration compared to other conditions and the three EndMT inductions (TGF- β 2, *SNAIL*, and *SNAIL*+TGF- β 2) were not able to form capillary-like structures. Some microRNAs were selected and evaluated by qPCR. The miR-let7a was significantly expressed in the *SNAIL* and *SNAIL*+TGF- β 2 groups. The assay of gain or loss of function of miR-let7a was realized; however, the repression or induction of miR-let7a did not change the EndMT. These results suggest that endothelial cells from distinct anatomical sources have different responses when stimulated to undergo the EndMT. Moreover, the association between *SNAIL*+TGF- β 2 is a potent inducer for EndMT and this induction can be mediated by Notch and non-canonical Wnt signaling pathway activation.

Keywords: EMT, EndMT, transcription factor, TGF- β 2.

RESUMEN

PINTO, M. T. **Evaluación de los factores inductores de la transición epitelio-mesénquima (EMT) en la biología de las células endoteliales.** 2015. 141h. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

La transición endotelio-mesénquima (EndMT) es una forma especializada de la transición epitelio-mesénquima (EMT) y está caracterizada por la alteración de la morfología celular para un formato fibroblastoide, pérdida de la expresión de los marcadores endoteliales y ganancia de la expresión de los marcadores mesenquimales, así como la adquisición de propiedades invasivas y migratorias. Sin embargo, el mecanismo molecular envuelto en ese proceso todavía no está completamente elucidado. El objetivo de ese trabajo fue evaluar los factores inductores de la EMT en células endoteliales (CEs) de fuentes distintas por medio de la superexpresión del factor de transcripción *SNAIL* y del tratamiento con TGF- β 2, como también identificar los mecanismos moleculares envueltos en ese proceso. Para eso, los linajes de CE de la arteria pulmonar (HPAEC), *pool* de CE primaria de vena del cordón umbilical (PHUVEC), CE del aorta (PAEC) y CE de la arteria coronaria (CAEC) fueron inducidos en tres condiciones distintas: I) TGF- β 2; II) superexpresión del factor de transcripción *SNAIL*; III) superexpresión del factor de transcripción *SNAIL* asociado al tratamiento con TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2). Después de la inducción, la expresión de los genes relacionados a la EndMT fue analizada por PCR en tiempo real (qPCR) y las CAEC fueron las células que presentaron mayor cambio en el perfil de expresión génica, en que el grupo *SNAIL*+TGF- β 2 presentó un aumento de los marcadores mesenquimales *FNI*, *SM22*, *CNN1* and *CD90*. El grupo *SNAIL*+TGF- β 2 también mostro una disminución de los marcadores endoteliales CD31 y CDH5 por *Western blot*. En seguida, la técnica de *microarray* fue realizada en las CAECs inducidas a la EndMT y los análisis revelaron un dendrograma cuyo perfil mostró que *SNAIL* y *SNAIL*+TGF- β 2 se agrupan separadamente de las otras condiciones. Los datos de *microarray* resultaron en una *network* en que los genes mesenquimales *COL1A1*, *COL1A2*, *FNI* y *CNN1* estaban aumentados en el grupo *SNAIL*+TGF- β 2 comparado con el grupo control. Los genes diferencialmente expresos entre el análisis CT vs. *SNAIL*+TGF- β 2 fueron analizados cuanto a la participación en vías canónicas y la vía de regulación de la EMT fue una de las más representadas, que incluye la vía de señalización Notch y Wnt. En los datos de *microarray*, *NOTCH3* y *WNT5B* estaban superexpresos en el grupo *SNAIL*+TGF- β 2 comparado con el control. Sabiendo que Wnt5b puede inhibir la vía β -catenina, la expresión de *NOTCH3*, *WNT5B* y β -*CATENINA* fue evaluada por qPCR y la expresión de *NOTCH3* y *WNT5B* confirmó los datos del *microarray* y ninguna diferencia estadística fue observada en la expresión de β -*CATENINA*. Aun, las CAECs inducidas fueron sometidas al ensayo de migración y de capacidad de formación de estructuras semejantes a capilares. Fue observado que las CAEC-*SNAIL*+TGF- β 2 migraron significativamente comparadas con las otras condiciones y ninguna de las células inducidas (TGF- β 2, *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2) fue capaz de formar estructuras semejantes a capilares. Algunos microRNAs fueron seleccionados y evaluados por qPCR. El miR-let7a fue significativamente expreso en el grupo *SNAIL* y *SNAIL*+TGF- β 2. El ensayo de pérdida y ganancia de función del miR-let7a fue realizado, sin embargo la represión o la inducción del miR-let7a no alteró la EndMT. Eses resultados sugieren que las CEs de fuentes anatómicas distintas presentan respuestas diferentes cuando estimuladas a sufrir EndMT. Además, la asociación entre *SNAIL*+TGF- β 2 es un potente inductor para EndMT y esa inducción puede ser mediada por las vías de señalización Notch y Wnt no canónica.

Palabras-llave: EMT, EndMT, factor de transcripción, TGF- β 2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema das alterações celulares durante o processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT).....	5
Figura 2.	Modelo esquemático da transição endotélio-mesenquimal (EndMT).....	9
Figura 3.	Mecanismos moleculares envolvidos no processo de EndMT.....	15
Figura 4.	Fluxograma da estratégia experimental.....	21
Figura 5.	Mapa dos vetores utilizados para transfecção das células endoteliais.....	25
Figura 6.	Morfologia das células PHUVEC, HPAEC, PAEC e CAEC durante a indução da EndMT pela superexpressão do fator de transcrição <i>SNAIL</i> associado ou não ao tratamento com TGF- β 2.....	42
Figura 7.	Quantificação relativa da expressão dos genes <i>CD31</i> , <i>CDH5</i> , <i>FN1</i> , α - <i>SMA</i> , <i>SM22</i> , <i>CNN1</i> , <i>CD90</i> , <i>FSP1</i> , <i>CDH2</i> e <i>SNAIL</i> nas PHUVECs induzidas à EndMT, utilizando PCR em tempo real.....	44
Figura 8.	Quantificação relativa da expressão dos genes <i>CD31</i> , <i>CDH5</i> , <i>FN1</i> , α - <i>SMA</i> , <i>SM22</i> , <i>CNN1</i> , <i>CD90</i> , <i>FSP1</i> , <i>CDH2</i> e <i>SNAIL</i> nas HPAECs induzidas à EndMT, utilizando PCR em tempo real.....	45
Figura 9.	Quantificação relativa da expressão dos genes <i>CD31</i> , <i>CDH5</i> , <i>FN1</i> , α - <i>SMA</i> , <i>SM22</i> , <i>CNN1</i> , <i>CD90</i> , <i>FSP1</i> , <i>CDH2</i> e <i>SNAIL</i> nas PAECs induzidas à EndMT, utilizando PCR em tempo real.....	46
Figura 10.	Quantificação relativa da expressão dos genes <i>CD31</i> , <i>CDH5</i> , <i>FN1</i> , α - <i>SMA</i> , <i>SM22</i> , <i>CNN1</i> , <i>CD90</i> , <i>FSP1</i> , <i>CDH2</i> e <i>SNAIL</i> nas CAECs induzidas à EndMT, utilizando PCR em tempo real.....	47
Figura 11.	Perfil de expressão dos genes relacionados com EndMT nas células PHUVEC, HPAEC, PAEC e CAEC após a indução.....	48
Figura 12.	Expressão das proteínas CD31, CDH5, SM22, SNAIL e GAPDH por <i>Western blot</i>	49
Figura 13.	Dendrograma mostrando o agrupamento hierárquico das CAECs induzidas à EndMT.....	51
Figura 14.	Comparação do padrão de expressão gênica entre os grupos CT, TGF- β 2, <i>SNAIL</i> e <i>SNAIL</i> +TGF- β 2, par a par.....	53
Figura 15.	<i>Heat map</i> e dendrograma gerado a partir dos 50 genes mais diferencialmente expressos nas comparações par a par entre os grupos Controle (CT), TGF- β 2, <i>SNAIL</i> e <i>SNAIL</i> +TGF- β 2.....	55

Figura 16.	Análise de interação dos genes com expressão diferenciada entre as comparações CT vs. <i>SNAIL</i> pelo <i>software Ingenuity Pathway Analysis</i>	57
Figura 17.	Análise de interação dos genes com expressão diferenciada entre as comparações CT vs. <i>SNAIL</i> +TGF- β 2 pelo <i>software Ingenuity Pathway Analysis</i>	58
Figura 18.	Validação dos genes diferencialmente expressos no <i>microarray</i> pelas metodologias de PCR em tempo real e <i>Western blot</i>	59
Figura 19.	Vias de sinalização canônicas gerada pelo <i>software Ingenuity Pathway Analysis</i> quando comparados os genes diferencialmente expressos do grupo controle com os grupos <i>SNAIL</i> e <i>SNAIL</i> +TGF- β 2.....	60
Figura 20.	Quantificação relativa da expressão dos genes envolvidos na via Notch (<i>NOTCH3</i>) e Wnt (<i>WNT5B</i> , β - <i>CATENINA</i>), utilizando PCR em tempo real.....	61
Figura 21.	Caracterização das células endoteliais CAECs quanto à formação de estruturas semelhantes a capilares.....	62
Figura 22.	Análise da motilidade das células CAECs após indução da EndMT.....	63
Figura 23.	Quantificação da expressão dos microRNAs (miRNAs) envolvidos na EMT nas células CAECs após indução da EndMT, utilizando PCR em tempo real.....	65
Figura 24.	Quantificação relativa da expressão do miR-let7a e dos genes envolvidos na EndMT (<i>CD31</i> , <i>CDH5</i> , <i>KRT19</i> , <i>FN1</i> , <i>COL1A1</i> , <i>FSP1</i> , <i>CD90</i> e <i>NOTCH3</i>), utilizando PCR em tempo real.....	67
Figura 25.	Esquema das alterações celulares obtidas no presente estudo durante o processo de transição endotélio-mesenquimal (EndMT).....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Linhagens celulares adquiridas comercialmente da <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC).....	22
Tabela 2.	Imunofenotipagem das células endoteliais.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Do inglês, <i>Adenomatosis polyposis coli</i>
ARNT	Translocador nuclear de hidrocarbonetos aril
ATCC	Do inglês, <i>American type culture collection</i>
BMP	Proteína morfogênica do osso
CAC	Carcinoma adenoide cístico
CAEC	Célula endotelial da artéria coronária
CAFs	Do inglês, <i>cancer-associated fibroblasts</i>
CCR	Câncer colorretal
CE	Célula Endotelial
CK1	Caseína cinase 1
DMEM	Meio essencial modificado de Dulbecco
EGM-2	Meio de crescimento endotelial-2
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
EndMT	Transição endotélio-mesenquimal
FSC	Do inglês, <i>Forward Scatter</i>
FSP1	Proteína específica de fibroblastos 1
FvW	Fator de von Willebrand
GSK-3	Glicogênio sintase quinase-3
HIF	Fatores induzido por hipóxia
HPAEC	Célula endotelial da artéria pulmonar
LRP5	Do inglês, Low density lipoprotein receptor-related protein 5
LRP6	Do inglês, Low density lipoprotein receptor-related protein 6
NED	Domínio extracelular de Notch
NICD	Domínio intracelular de Notch
PAEC	Células endoteliais da aorta
PBS	Solução salina tamponada de fosfato
PHUVEC	<i>Pool</i> de células endoteliais primárias de veia de cordão umbilical
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SNAIL	Do inglês, <i>Snail family zinc finger 1</i>
SSC	Do inglês, Side Scatter
SLUG	Do inglês, <i>Snail family zinc finger 2</i>
TGF-β	Do inglês, <i>Transforming growth factor-beta</i>
TRPS1	Do inglês, <i>Trichorhinophalangeal syndrome I</i>
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
WB	Western blot
ZEB	Do inglês, <i>Zinc finger E-box-binding homeobox</i>

Nota sobre a nomenclatura de genes

O presente trabalho inclui grande número de genes, cujos nomes serão mantidos em inglês, seguindo a nomenclatura da *Human Genome Organization* (HUGO). Foram adotadas algumas regras para a grafia dos genes, como indicado por Splendore (2005). Portanto, o gene humano foi grafado em letras maiúsculas e em itálico (ex: *SNAIL*) e a proteína humana foi grafada em letras maiúsculas (ex: SNAIL) (SPLENDORE, 2005).

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

I. INTRODUÇÃO	3
1. Células epiteliais, endoteliais e mesenquimais	3
2. Transição epitélio-mesenquimal (EMT)	4
3. Transição endotélio-mesenquimal (EndMT)	5
4. EndMT no desenvolvimento embrionário e durante processos patológicos	7
5. Fatores moleculares relacionados com a EndMT	9
5.1 Fatores de crescimento transformador beta (TGF- β)	9
5.2 Fatores de transcrição	10
5.3 Via de sinalização Notch	11
5.4 Via de sinalização Wnt	13
5.5 Hipóxia	13
5.6 microRNAs (miRNAs)	15
II. OBJETIVOS	19
III. MATERIAIS E MÉTODOS	22
1. Cultivo e expansão das linhagens de células endoteliais (CEs)	22
2. Aspectos de Biossegurança	22
3. Imunofenotipagem das células por meio de citometria de fluxo	23
4. Preparação do DNA plasmidial	23
4.1 Transformação de bactérias competentes	23
4.2 Cultura de bactérias em meio líquido	23
4.3 Extração do DNA plasmidial	24
4.4 Reação de digestão dos vetores com enzimas de restrição	24
5. Indução da EndMT por superexpressão de fator de transcrição <i>SNAIL</i>	24
5.1 Produção de lentivírus em células 293FT	24
5.2 Transdução das células endoteliais com lentivírus	26
5.3 Cultivo das células transduzidas com <i>SNAIL</i> e tratadas com TGF- β 2	26
6. Indução da EndMT pelo tratamento com TGF- β 2	27
7. Extração do RNA total	27
8. Reação de transcrição reversa	28
9. Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	28

9.1 Análises estatísticas.....	29
10. Análise da expressão proteica por <i>Western blot</i> (WB).....	29
10.1 Preparo das amostras.....	29
10.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	30
10.3 Transferência da amostra para membrana de nitrocelulose.....	30
10.4 Bloqueio da membrana.....	30
10.5 Marcação com anticorpo primário e secundário.....	31
11. Análise de expressão gênica global pelo método de <i>microarray</i>	31
11.1 Seleção das amostras.....	32
11.2 Preparação dos <i>Spikes</i>	32
11.3 Reação de marcação.....	32
11.4 RNA <i>Cleanup</i>	33
11.5 Quantificação do cRNA.....	33
11.6 Hibridização.....	34
11.7 Lavagem das lâminas de <i>microarray</i>	34
11.8 Escaneamento das lâminas de <i>microarray</i>	35
11.9 Análise dos resultados.....	35
12. Ensaio de formação de estruturas semelhantes a capilares em Matrigel®.....	35
13. Ensaio de migração celular (<i>scratch assay</i>).....	36
14. Análise da expressão dos microRNAs (miRNA).....	37
14.1 Reação de Transcrição Reversa – miRNA.....	37
14.2 Análise da expressão dos miRNAs por PCR quantitativa (qPCR).....	37
14.3 Ensaio de perda e ganho de função.....	38
14.4 Análises estatísticas.....	38
IV. RESULTADOS.....	40
1. Caracterização imunofenotípica das células endoteliais.....	40
2. Indução das células endoteliais pela superexpressão do <i>SNAIL</i> e pelo tratamento com TGF-β2.....	41
2.1 Análise morfológica das células endoteliais induzidas à EndMT.....	41
2.2 Análise da expressão gênica das células endoteliais induzidas à EndMT.....	43
2.3 Análise geral da expressão gênica das células endoteliais induzidas à EndMT.....	48
2.4 Análise da expressão proteica das CAECs induzidas à EndMT.....	49
3. Análise de expressão gênica global pelo método de <i>microarray</i>	50
3.1 Processamento dos dados.....	50
3.2 Semelhanças nos níveis de expressão.....	50

3.3 Análises dos genes diferencialmente expressos	51
3.4 Caracterização dos perfis de expressão gênica das CAECs submetidas à EndMT.....	54
3.5 Obtenção de redes gênicas	56
3.6 Validação dos genes diferencialmente expressos.....	59
3.7 Análises das vias de sinalização.....	60
4. Avaliação da formação de estruturas semelhantes a capilares em Matrigel®	61
5. Avaliação da migração celular após a indução da EndMT	63
6. Expressão dos microRNAs durante a EndMT	64
6.1 Seleção e análise dos microRNAs envolvidos com a EndMT	64
6.2 Ensaio funcional para o miR-let7a	66
V. DISCUSSÃO	69
VI. CONCLUSÃO	79
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
APÊNDICES	92
APÊNDICE A – Gene diferencialmente expresso na comparação entre as CAEC controle (CT) e transduzidas com o vetor vazio (<i>Empty</i>).....	92
APÊNDICE B – Lista dos 100 genes mais diferencialmente expressos na comparação CT vs. <i>SNAIL</i>	93
APÊNDICE C – Lista dos 100 genes mais diferencialmente expressos na comparação CT vs. <i>SNAIL</i> +TGF- β 2.....	94
APÊNDICE D – Lista dos 100 genes mais diferencialmente expressos na comparação <i>SNAIL</i> vs. TGF- β 2.....	95
APÊNDICE E – Lista dos 100 genes mais diferencialmente expressos na comparação <i>SNAIL</i> +TGF- β 2 vs. TGF- β 2.....	96
APÊNDICE F – Lista dos 20 genes diferencialmente expressos na comparação <i>SNAIL</i> vs. <i>SNAIL</i> +TGF- β 2.....	97
ANEXO.....	99
Anexo I - Aceite da Coordenação-Geral da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).....	99
CAPÍTULO II	
1. Avaliação da resposta das células endoteliais mediante a indução da EndMT pelo TGF- β e hipóxia.....	101
Artigo Científico	102



Capítulo I

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Células epiteliais, endoteliais e mesenquimais

O tecido epitelial se caracteriza pela presença de células epiteliais justapostas, entre as quais há pouca matriz extracelular. Este tecido possui diversas funções como revestimento de superfícies, absorção de moléculas, secreção, percepção de estímulos e contração. Para exercer essas funções, o epitélio conta com lâminas e membranas basais que o conectam ao tecido conjuntivo, ao qual se encontra subjacente. Desse modo, um dos lados do epitélio está sempre aderido ao tecido conjuntivo (pólo basal), ao passo que o seu ápice se encontra exposto ao espaço livre (pólo apical), configurando a polaridade apical-basal. Os epitélios são classificados de acordo com sua estrutura e função. Dessa forma, o epitélio que reveste os vasos sanguíneos e linfáticos é um exemplo de epitélio pavimentoso simples e é denominado endotélio. Esta estrutura é formada por uma monocamada de células endoteliais intimamente ligadas entre si e caracteriza-se por ser avascular, obtendo os nutrientes de que necessitam a partir dos vasos sanguíneos presentes na camada de tecido conjuntivo. Além das funções de revestimento e delimitação, o endotélio exibe outras funções essenciais do ponto de vista fisiológico como o controle do tráfego de moléculas por atuar como uma membrana semipermeável e síntese e metabolismo de diversas substâncias. Ademais, o seu principal papel está relacionado com a regulação do fluxo sanguíneo, resistência vascular e com a modulação das respostas imunológicas e inflamatória (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2009).

As células epiteliais e endoteliais são organizadas em camadas e aderidas firmemente umas às outras por meio de junções intercelulares, incluindo junção de aderência, junção de oclusão, junção comunicante (junção *gap*) e desmossomos, formando, portanto, as junções célula-célula (LEE et al., 2006; MEDICI; KALLURI, 2012). As células epiteliais são conhecidas por expressarem alguns marcadores específicos, tais como E-caderina, ocludinas, citoqueratinas e desmoplaquina (AVIZIENYTE et al., 2005; SIPOS; GALAMB, 2012), enquanto que as células endoteliais expressam VE-caderina (CD144), PECAM/CD31, TIE1, TIE2, receptor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) 1/2 e fator von Willebrand (FvW) (POTENTA; ZEISBERG; KALLURI, 2008). Em cultura celular, ambas as células epitelial e endotelial apresentam morfologia poliédrica (SUSIENKA; MEDICI, 2013).

Diferente das células epiteliais e endoteliais, as células mesenquimais são alongadas apresentando morfologia fibroblastoide e sua identificação é baseada na expressão de um conjunto de marcadores, incluindo FSP1 (*fibroblast-specific protein 1*, também conhecido

como S100A4), α -SMA (*α -smooth muscle actin*), vimentina, fibronectina, colágeno tipo 1 e N-caderina (SAITO, 2013) . Além disso, a aderência entre as células mesenquimais não é robusta, o que contribui para a sua capacidade migratória.

2. Transição epitélio-mesenquimal (EMT)

Em 1982, foi demonstrada pela primeira vez a transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *Epithelial-mesenchymal transition*), um processo no qual as células epiteliais perdem as suas características e adquirem propriedades de células mesenquimais (GREENBURG; HAY, 1982). Durante essa transição, as células epiteliais perdem a polaridade celular por regular negativamente a expressão de citoqueratinas e moléculas de adesão como, por exemplo, E-caderina, adquirindo um fenótipo mesenquimal (Figura 1). Tal fenótipo é enfatizado pelo aumento da capacidade migratória e invasiva, resistência a apoptose e aumento da produção de componentes da matriz extracelular (KALLURI; WEINBERG, 2009).

O programa EMT pode ocorrer de três maneiras distintas. O tipo 1 está relacionado com a EMT embrionária, no qual durante o desenvolvimento, a EMT desempenha um papel crítico em vários estágios, incluindo a gastrulação, em que o epitélio embrionário origina o mesoderma, e na delaminação da crista neural. O tipo 2 está relacionado com a cicatrização e regeneração de tecidos causados por traumas e/ou lesões inflamatórias. Por fim, a EMT associada com câncer epitelial durante os processos de invasão e metástase são propostos para constituir o terceiro tipo de EMT (NIETO, 2001; SHOOK; KELLER, 2003; THIERY et al., 2009; ZEISBERG; NEILSON, 2009). Portanto, a EMT é crítica para a embriogênese e para o desenvolvimento dos órgãos e está relacionada com várias condições patológicas, incluindo fibrose e progressão do câncer (KALLURI; WEINBERG, 2009). Ainda, evidências indicam que a ativação aberrante do programa de desenvolvimento da EMT contribui para invasão tumoral, disseminação da metástase e aquisição de resistência terapêutica (THIERY et al., 2009).

A EMT possui uma forma importante e especializada, também envolvida em processos fisiológicos e patológicos, denominada transição endotélio-mesenquimal (EndMT, do inglês *Endothelial-mesenchymal transition*).

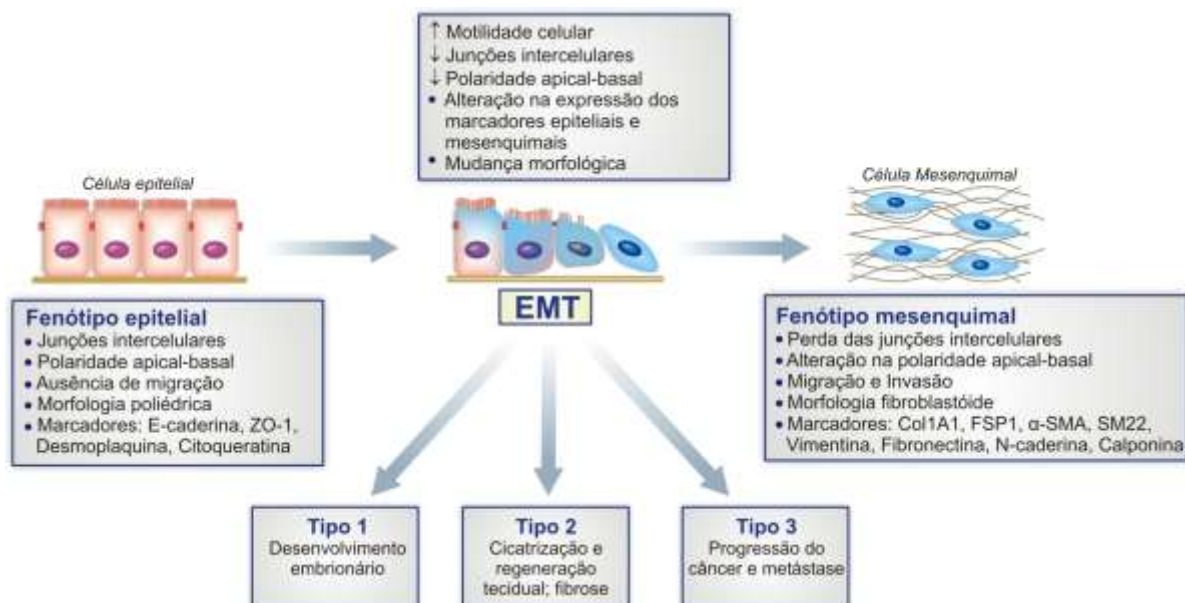


Figura 1. Esquema das alterações celulares durante o processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT). No início da EMT, as células epiteliais apresentam junções celulares, polaridade apical-basal, morfologia poliédrica, não possuem capacidade migratória e expressam os marcadores E-caderina, desmoplaquina, citoqueratina e a proteína da zônula de oclusão (ZO-1). Durante a EMT, as células epiteliais perdem as junções intercelulares, a polaridade apical-basal e alteram a morfologia e a expressão dos seus marcadores adquirindo um fenótipo mesenquimal. A célula mesenquimal apresenta morfologia fibroblastoide e expressão dos marcadores mesenquimais Col1A1, FSP1, α -SMA, SM22, vimentina, fibronectina, N-caderina e calponina, bem como a característica de migração e invasão. A EMT é classificada em três tipos: tipo 1 relacionado com o desenvolvimento embrionário; tipo 2 associado a cicatrização e regeneração teciduais e fibrose; tipo 3 associado com a progressão do câncer e metástase.

3. Transição endotélio-mesenquimal (EndMT)

As células endoteliais (CEs), que compõe o endotélio, originam-se do mesoderma esplâncnico do embrião e posteriormente se diferenciam em estruturas vasculares nos diferentes tecidos e órgãos (FIDLER; ELLIS, 2004). Os vasos formados durante a embriogênese podem se especializar nas seguintes estruturas: artérias, veias e capilares, os quais apresentam estrutura e funções diferentes. Essas diferenças são baseadas na presença e quantidade de células musculares lisas e nas características específicas da matriz extracelular na parede do vaso. As artérias são vasos espessos que saem do coração levando sangue para os órgãos e tecidos do corpo. É composta por três camadas: i) endotélio, que é formado por uma única camada de célula; ii) camada mediana, constituída por tecido muscular liso; iii)

camada mais externa formada por tecido conjuntivo.

Com relação às veias, estas são vasos que chegam ao coração trazendo sangue dos tecidos e órgãos. Assim como as artérias, as veias também são formadas por três camadas. Entretanto, as camadas muscular e conjuntiva são menos espessas. Vasos de pequeno calibre denominados capilares também são responsáveis pelas trocas metabólicas entre o sangue e os tecidos circunvizinhos e apresentam apenas uma camada de células endoteliais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2009). Dessa forma, as células endoteliais que revestem os diferentes vasos sanguíneos apresentam especializações regionais na morfologia e funções (CHI et al., 2003).

Dada a diversidade de canais vasculares e as diferenças associadas na hemodinâmica, estrutura e origem embrionária, é esperado que células endoteliais de diversos vasos apresentem diferentes especializações regionais. Entretanto, o conhecimento da diversidade das células endoteliais é limitado. Chi e colaboradores (2003) avaliaram a expressão gênica global das células endoteliais nos diferentes tipos de vasos sanguíneos e localizações anatômicas com o objetivo de analisar a diversidade dessas células. Foi demonstrado que células endoteliais de diferentes vasos sanguíneos e células endoteliais microvasculares de diferentes tecidos têm características e perfis distintos (CHI et al., 2003).

As células endoteliais executam funções adicionais além do revestimento da parede dos vasos, como a plasticidade de transitar para outro fenótipo. Em 1977, foi descrito que durante o desenvolvimento do coração, o mesênquima era formado a partir de células endoteliais, constatando que as células endoteliais eram capazes de transitar para um fenótipo mesenquimal (MARKWALD; FITZHARRIS; MANASEK, 1977), destacando o papel de plasticidade da célula endotelial. Esse fenômeno ficou conhecido com transição endotélio-mesenquimal (EndMT). Nesse mecanismo, as CEs perdem as junções célula-célula havendo uma alteração na organização e composição do citoesqueleto, no qual induz uma mudança na morfologia celular condizente com um formato fusiforme. Durante a transição, as CEs perdem a expressão dos marcadores endoteliais específicos, como VE-caderina e CD31 e passam a expressar os marcadores mesenquimais, como FSP1, α -SMA, vimentina, fibronectina, colágeno tipo I, N-caderina, SM22 e calponina (HE et al., 2013; KOKUDO et al., 2008; LIU, 2011; MEDICI; KALLURI, 2012; PIERA-VELAZQUEZ; LI; JIMENEZ, 2011; POTENTA; ZEISBERG; KALLURI, 2008). Ademais, as CEs adquirem propriedades invasivas e migratórias, permitindo-lhes atingir tecidos circundantes (Figura 2).

A partir da descrição da EndMT, diversos estudos foram realizados na tentativa de elucidar o papel da mesma em processos fisiológicos e patológicos, bem como as vias de

sinalização que podem estar envolvidas nesse mecanismo.

4. EndMT no desenvolvimento embrionário e durante processos patológicos

A EndMT é um processo complexo e apresenta um importante papel durante a formação do sistema cardiovascular. Durante a embriogênese, o coração é um dos primeiros órgãos a ser formado e suas paredes são constituídas de três túnicas: o endocárdio, o miocárdio e o epicárdio. O endocárdio é constituído pelo endotélio que repousa sobre uma camada subendotelial de tecido conjuntivo frouxo. O miocárdio é a túnica mais espessa composta por células musculares cardíacas, enquanto o epicárdio consiste em tecido conjuntivo coberto por epitélio pavimentoso simples (mesotélio) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2009).

As células do endocárdio inicialmente expressam fenótipo endotelial (VE-caderina, Tie-1/2, VEGFR 1/2 e CD31) no canal átrio-ventricular. Em seguida, essas células adquirem fenótipo mesenquimal e invadem os tecidos ao redor, formando a porção mesenquimal dos septos e válvulas cardíacas (ARMSTRONG; BISCHOFF, 2004; EISENBERG; MARKWALD, 1995; LIEBNER et al., 2004). Arciniegas et al. (2005) demonstraram que a EndMT também participa no desenvolvimento da artéria pulmonar (ARCINIEGAS et al., 2005).

Ademais, a EndMT desempenha um papel importante no reparo tecidual. Foi evidenciado que as células endoteliais originam células mesenquimais, no qual apresentam ativação da via de sinalização Wnt após quatro dias do infarto do miocárdio (IM). Aisagbonhi e colaboradores (2011) mostraram que uma semana após a lesão isquêmica, houve acúmulo de um grande número de células Wnt⁺ na área do enfarto durante a formação do tecido de granulação. Além da ativação de Wnt, foi observado a ocorrência da EndMT após o IM e a mesma atinge o seu ponto máximo durante a formação do tecido de granulação. Portanto, a ativação da via de sinalização Wnt e EndMT são respostas moleculares e celulares para o IM e a via Wnt é uma propriedade característica de células mesenquimais derivadas de EndMT que participam no reparo do tecido cardíaco após o IM (AISAGBONHI et al., 2011).

Estudos evidenciam que a EndMT ocorre em uma série de processos patológicos, contribuindo assim para a fisiopatogênese de diversas doenças. A EndMT está relacionada intimamente com doenças fibróticas como fibrose cardíaca, pulmonar e renal. A fibrose cardíaca está associada a uma diminuição da extensão da microcirculação e com o rompimento das estruturas do miocárdio normal, o qual é mediado pelo recrutamento de

fibroblastos. Zeisberg e colaboradores (2007) mostraram que esses fibroblastos são originados de células endoteliais, sugerindo a ocorrência da EndMT (ZEISBERG et al., 2007a). O mesmo foi observado em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, onde as células endoteliais dos capilares pulmonares deram origem a um número significativo de fibroblastos por meio da EndMT (HASHIMOTO et al., 2010). Zeisberg e colaboradores (2008) avaliaram a contribuição da EndMT para a fibrose renal em três modelos de doença crônica renal: i) uropatia obstrutiva unilateral, ii) diabetes induzida por estreptozotocina e iii) doença renal de Alport. Foi observado que aproximadamente 30 a 50% dos fibroblastos co-expressavam o marcador endotelial CD31 e os marcadores de fibroblastos e miofibroblastos, tais como FSP1 e α -SMA. Portanto, os autores sugerem que a EndMT contribui para o acúmulo de fibroblastos e miofibroblastos ativados na fibrose renal e sugerem a EndMT como um potencial alvo terapêutico (ZEISBERG et al., 2008).

A EndMT também está associada ao câncer. O microambiente tumoral desempenha um papel essencial no crescimento tumoral, angiogênese e metástase e é composto por diversos componentes, dentre eles os fibroblastos associados ao câncer, conhecidos como CAFs (*cancer-associated fibroblasts*) (FUKUMURA; JAIN, 2007; VAN MEETEREN; TEN DIJKE, 2012). É sabido que os fibroblastos facilitam a progressão do tumor (POTENTA; ZEISBERG; KALLURI, 2008), entretanto a origem desses fibroblastos ainda não está totalmente elucidada. Zeisberg e colaboradores (2007) exploraram a hipótese de que a proliferação das células endoteliais poderia contribuir para a formação de CAFs via o processo de EndMT. Para tanto, foi utilizado dois diferentes modelos murinos de carcinogênese e observaram que 40% dos CAFs foram formados pelo processo de EndMT e os mesmos co-expressaram o marcador endotelial CD31 e o marcador mesenquimal FSP1 e α -SMA. Portanto, esses dados sugerem que as células endoteliais contribuem para o *pool* de CAFs via EndMT (ZEISBERG et al., 2007b).

Pesquisas demonstram ainda que células endoteliais microvasculares transitam para células mesenquimais em resposta a estímulos inflamatórios crônicos (LIPTON; BENSCH; KARASEK, 1992; ROMERO et al., 1997) e há indícios de que a EndMT está associada com a arteriosclerose, reestenose, vasculite, hipertensão pulmonar e queiloide (Figura 2) (ARCINIEGAS et al., 2007; BERANEK, 1995; LEE et al., 2015; RANCHOUX et al., 2015)

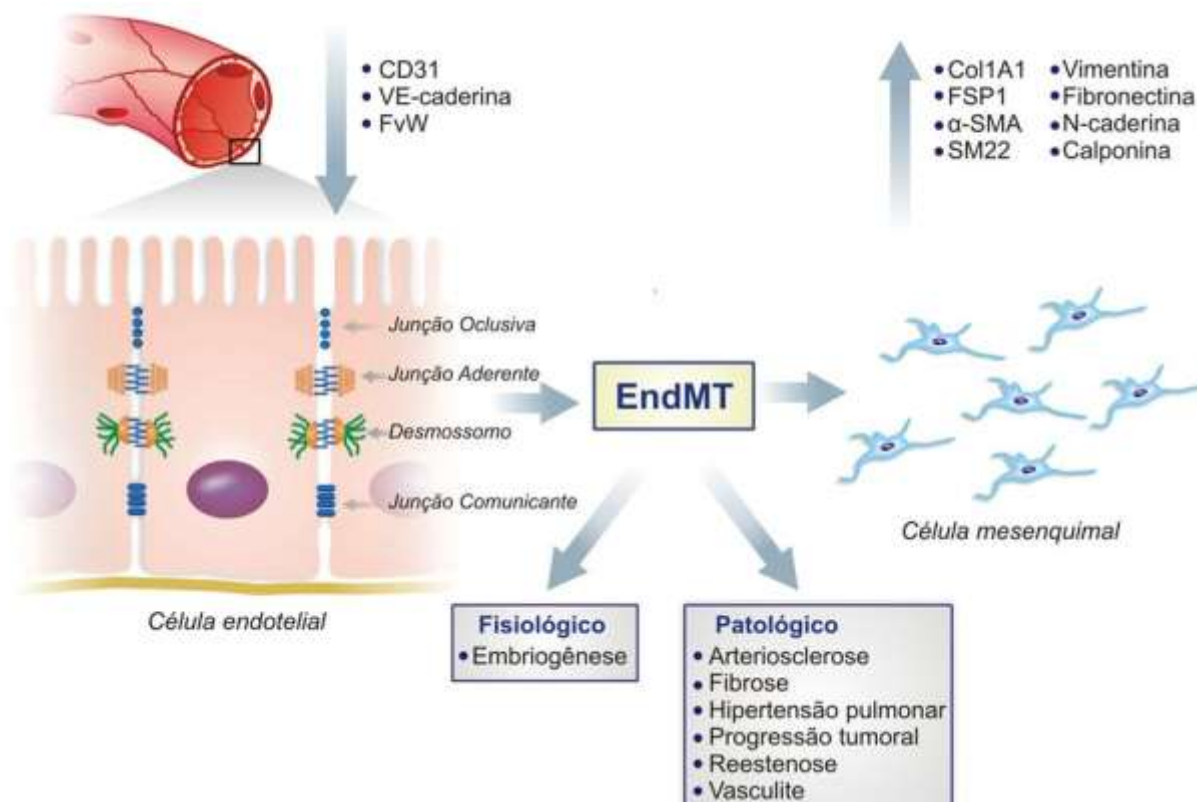


Figura 2. Modelo esquemático da transição endotélio-mesenquimal (EndMT). O programa da EndMT é caracterizado pela diminuição da expressão dos marcadores endoteliais CD31, VE-caderina e Fator de vonWillebrand (FvW) e aumento da expressão dos marcadores mesenquimais Col1A1, FSP1, α -SMA, SM22, vimentina, fibronectina, N-caderina e calponina. A EndMT está relacionada com processos fisiológicos (embriogênese) e com processos patológicos tais como arteriosclerose, fibrose, hipertensão pulmonar, progressão tumoral, reestenose e vasculite.

5. Fatores moleculares relacionados com a EndMT

Em contraste aos extensos estudos focados nos mecanismos moleculares envolvidos com a EMT, existe uma escassez de informações relacionadas à EndMT, e poucos estudos têm examinado intimamente os mecanismos envolvidos nesse processo. Entretanto, presume-se que ambas as transições compartilham das mesmas vias de sinalização.

5.1 Fatores de crescimento transformador beta (TGF- β)

TGF- β (*transforming growth factor beta*) é o fator estimulante mais comum da EndMT. A superfamília do TGF- β é um grupo de proteínas regulatórias multifuncionais

estruturalmente relacionadas que participam de uma gama de processos biológicos, tais como proliferação, diferenciação e desenvolvimento (PENG, 2003). Os membros-chaves dessa família incluem TGF- β e a proteína morfogênica óssea (BMPs, do inglês *bone morphogenic proteins*) (DE CAESTECKER, 2004). Existem três isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) e todas exercem efeito biológico ao se ligarem aos receptores T β RI e T β RII. Após a ligação do ligante ao T β RII, T β RI é ativado e fosforila os Smads (Smad2 e Smad3), que por sua vez se liga a Smad4 formando um complexo que se translocará para o núcleo para modular a expressão gênica (Figura 3) (DO et al., 2008; TEN DIJKE; HILL, 2004).

O papel do TGF- β foi avaliado na indução da EMT por Do e colaboradores (2008) que investigaram o potencial do TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 para iniciar a EMT em células de câncer de ovário. Foi observado que as três isoformas foram capazes de induzir eficientemente a EMT, levando a perda das junções célula-célula e ao fenótipo mesenquimal. Ainda, a indução da EMT pelo TGF- β aconteceu pela ativação da via de sinalização dependente de Smad (Smad3) (DO et al., 2008).

Similar à EMT, o fator de crescimento TGF- β também é capaz de induzir a EndMT. Zeisberg e colaboradores (2007) mostraram que TGF- β 1 induz EndMT em células endoteliais coronárias, enquanto BMP-7 inibe esse processo, preservando o fenótipo endotelial (ZEISBERG et al., 2007a). Adicionalmente, BMP-2, BMP-4, TGF- β 2 e TGF- β 3 são requeridos para iniciar e completar a EndMT (ARMSTRONG; BISCHOFF, 2004). Por outro lado, Azhar e colaboradores (2009) realizaram o *knockdown* de TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 em camundongos e avaliaram que a EndMT acontecia normalmente com o *knockdown* de TGF- β 1 e TGF- β 3, levando ao desenvolvimento do coração. Entretanto, com o *knockdown* de TGF- β 2 houve uma inibição da EndMT, uma diminuição significativa no número de células mesenquimais e conseqüentemente o não desenvolvimento do coração, sugerindo que somente a isoforma TGF- β 2 é requerida para a ocorrência da EndMT cardíaca (AZHAR et al., 2009).

5.2 Fatores de transcrição

Estudos demonstraram que alguns fatores de transcrição tais como SNAIL, SLUG, TWIST1, ZEB1, ZEB2, FOXC2, KLF8 e TCF3 apresentam um papel crítico na EMT (BRIEGEL, 2006; MANI et al., 2008; OUYANG et al., 2010). Uma vez que esses fatores são ativados, ocorre a inibição da transcrição do gene da E-caderina resultando na perda das junções célula-célula e no ganho da capacidade migratória e invasiva (NIETO, 2011).

A expressão de TWIST é essencial no processo de metástase. A expressão ectópica de TWIST resulta na perda da adesão célula-célula mediada por E-caderina, na ativação de marcadores mesenquimais e indução da motilidade celular. No carcinoma lobular invasivo, foi observada uma correlação inversa entre os níveis de expressão de TWIST e E-caderina, sugerindo que esse fator de transcrição contribui para a metástase por promover a EMT (YANG et al., 2004). Assim também, a alta expressão de ZEB1 e ZEB2, foi significativamente associada com o fenótipo mesenquimal nas células cancerígenas pancreáticas do tumor primário (KURAHARA et al., 2012). Ademais, a superexpressão do fator de transcrição SNAIL induziu a EMT nas células SCC9, oriundas de carcinoma oral, ocorrendo uma diminuição dos marcadores epiteliais E-caderina e β -catenina, aumento do marcador mesenquimal vimentina, ganho das propriedades invasiva e migratória, bem como morfologia fibroblastoide (ZHU et al., 2012).

A participação de alguns fatores de transcrição relacionados com a EMT também foi descrita na EndMT. Medici e colaboradores (2011) avaliaram o papel do TGF- β 2, bem como do fator de transcrição SNAIL na EndMT. Para tanto, os autores trataram as células endoteliais microvasculares cutâneas com TGF- β e observaram um aumento de SNAIL após o tratamento. Esse aumento foi acompanhado pela mudança morfológica condizente com morfologia fibroblastoide, pela diminuição da expressão dos marcadores endoteliais VE-caderina e CD31 e pelo aumento dos marcadores mesenquimais FSP1 e α -SMA. Com o aumento da expressão de SNAIL, sugeriu-se que o mesmo poderia induzir a EndMT. Foi realizado um *knockdown* de SNAIL juntamente com o tratamento com TGF- β 2 e observou-se que com o SNAIL-*knockdown* não havia mudança na morfologia, diminuição dos marcadores endoteliais e aumento dos marcadores mesenquimais, ao passo que as células endoteliais transfectadas com o *knockdown* controle e tratadas com TGF- β 2 sofreram EndMT, sugerindo que a expressão de SNAIL é essencial para a ocorrência do mecanismo de EndMT (MEDICI; POTENTA; KALLURI, 2011).

Um estudo analisou a função do TGF- β 2 na EndMT em células endoteliais derivadas de células-tronco embrionárias murinas e os autores relataram que o tratamento de células endoteliais com TGF- β 2 induziu a expressão de marcadores mesenquimais nessas células, no qual as alterações foram mediadas pelo fator de transcrição SNAIL (KOKUDO et al., 2008).

5.3 Via de sinalização Notch

A via de sinalização Notch tem importante papel no destino da célula durante a

morfogênese e desenvolvimento embrionário por regular uma série de processos celulares, incluindo proliferação e diferenciação celular e apoptose (ARTAVANIS-TSAKONAS; RAND; LAKE, 1999; BRAY; FURRIOLS, 2001; BRAY, 2006; KOPAN; ILAGAN, 2009). Além disso, a via Notch está relacionada com diversas patologias como doenças cardiovasculares e tumorigênese (JOUTEL; TOURNIER-LASSERVE, 1998).

Até o momento, foram identificados quatro receptores para Notch (Notch1–Notch4) em mamíferos, os quais são formados por dois domínios estruturais: um domínio extracelular (NED, do inglês *Notch extracellular domain*) e um intracelular (NICD, do inglês *Notch intracellular domain*). Os ligantes dos receptores Notch são Delta-like (Dll1, Dll3, Dll4) e Jagged (JAG1 e JAG2). A via Notch é iniciada pela interação receptor-ligante entre células adjacentes e essa interação ocasiona a clivagem do domínio extracelular do receptor Notch (NED) que sofre endocitose pela célula que expressa o ligante. Posteriormente, ocorre uma segunda reação proteolítica mediada por um complexo enzimático denominado gama-secretase resultando na liberação do domínio intracelular de Notch (NICD). O NICD é transportado para o núcleo e age como co-ativador transcricional, o qual se associa a uma proteína ligada ao DNA, denominada CSL, ocorrendo assim o recrutamento de co-ativadores e consequentemente a expressão de genes-alvo (Figura 3) (NAM et al., 2003, 2006; WU et al., 2002).

É sabido que a via Notch contribui para o processo de EMT. Recentemente, foi descrito que a via Notch possui um papel vital na progressão do carcinoma adenoide cístico (CAC) através da sua relação com a progressão da EMT. Os autores relataram que Notch induz EMT para promover a invasão e metástase do CAC. Entretanto, quando Notch foi inibida por γ -secretase, a progressão da EMT foi diminuída, bem como a habilidade de migração e invasão. Ainda, a via Notch também foi relacionada com o câncer colorretal (CCR), onde os tumores dos pacientes apresentaram alta expressão de Notch1 quando comparado com os indivíduos normais. Esses dados sugerem a importância da via de sinalização Notch no fenótipo de CCR e que essa via pode ter grande valor terapêutico (ZHAO et al., 2015).

Assim como na EMT, o papel da via de sinalização Notch na indução da EndMT também tem sido estudado. Um estudo sugeriu que a ativação da via Notch nas células endoteliais pode induzir o fenótipo mesenquimal e sugere que a interação Jagged1-Notch pode contribuir para a formação do coxim endocárdico por induzir a EndMT (NOSEDA et al., 2004).

5.4 Via de sinalização Wnt

Wnts são glicoproteínas secretadas e compreendem uma família de 19 proteínas (KOMIYA; HABAS, 2008). A via de sinalização Wnt é iniciada com a ligação dos ligantes Wnts aos receptores Frizzled e co-receptores LRP5 (*low-density lipoprotein receptor related protein-5*) e LRP6. Essa ligação pode ocasionar a ativação da via canônica, também conhecida como dependente de β -catenina, ou da via não canônica, independente de β -catenina (CRISTANCHO; LAZAR, 2011; RAO; KÜHL, 2010). A β -catenina geralmente é fosforilada e degradada por outras proteínas que fazem parte de um complexo de degradação (Axina, *Adenomatosis polyposis coli* (APC), caseína cinase 1 (CK1) e glicogênio sintase quinase (GSK-3)). Entretanto, uma vez que a via canônica Wnt é ativada, a β -catenina deixa de ser fosforilada e se acumula no citoplasma. Dessa forma, a β -catenina é translocada para o núcleo e se liga aos fatores de transcrição TCF/LEF com a finalidade de ativar a transcrição de genes-alvo (Figura 3) (MAO et al., 2001; TIAN; HE; LEI, 2014).

A via de sinalização Wnt exerce um importante papel durante o desenvolvimento embrionário e fetal, bem como nos processos celulares, tais como migração celular, polaridade celular e determinação do destino das células (MACDONALD; TAMAI; HE, 2009). Além disso, a via Wnt é essencial para a ocorrência da EMT. Foi descrito que a expressão aberrante de β -catenina pode conferir às células cancerosas capacidade de *stemness* e de sofrer EMT, promovendo a progressão do tumor maligno. GSK-3 β é um inibidor endógeno do fator de transcrição Snail e uma vez que a fosforilação do GSK-3 β é inibida ocorre à ativação de Snail e da EMT. Dessa forma, a inibição da função de GSK-3 β por Wnt e por outras vias podem promover a estabilidade de Snail para induzir a EMT (BACHELDER et al., 2005; ZHOU et al., 2004).

Além disso, a via Wnt desempenha um importante papel na EndMT durante o desenvolvimento cardíaco. Liebner e colaboradores (2004) mostraram que uma vez que as células endoteliais deficientes para β -catenina são estimuladas com TGF- β 2, as mesmas exibem uma diminuição na capacidade de expressar α -SMA e sofrer EndMT. Estes resultados sugerem que existe uma interação entre o TGF- β e a via de sinalização de Wnt na indução da EndMT (LIEBNER et al., 2004).

5.5 Hipóxia

O oxigênio é essencial para a vida eucariótica e alterações em sua concentração, tais

como a hipóxia, podem levar à disfunção celular e órgão.

Em condições de normóxia, o oxigênio difunde livremente pelas células levando a modificações pós-traducionais de diferentes proteínas, incluindo o fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1 α), o qual é degradado. Entretanto, em condição de hipóxia, os níveis de HIF-1 α aumentam, a molécula é translocada para o núcleo e se associa a HIF-1 β , também conhecido como translocador nuclear de hidrocarbonetos aril (ARNT, do inglês *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), com a finalidade de atuar como fator de transcrição e regular a expressão de genes-alvo (Figura 3) (NATH; SZABO, 2012; SEMENZA, 1998).

A hipóxia é outra condição na qual pode ocorrer a formação de fibroblastos dependentes da EndMT (HIGGINS et al., 2008; REYNOLDS et al., 2012). Quando um tumor aumenta de tamanho, ele naturalmente torna-se hipóxico. Essa falta de oxigênio ativa HIF-1, que será responsável por estimular a expressão de fatores de crescimento endotelial para induzir a angiogênese tumoral, sendo um mecanismo importante para o crescimento de tumores e metástases (LU; KANG, 2010). O estado de hipóxia foi associado à EMT e metástase (JIANG; TANG; LIANG, 2011) e é sugerido que com o crescimento dos tumores, estes tornam-se mais hipóxicos, ocorrendo, portanto, uma maior incidência na formação de CAFs através da EndMT (MEDICI; KALLURI, 2012).

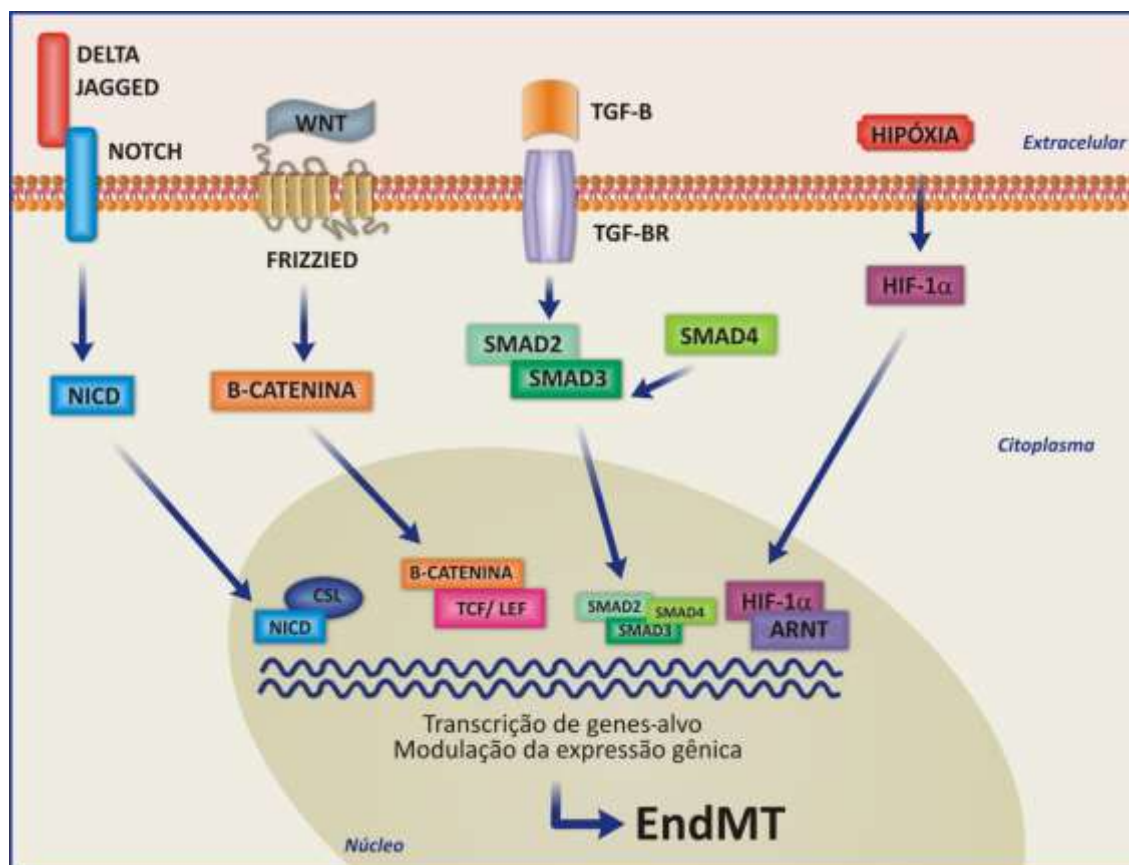


Figura 3. Mecanismos moleculares envolvidos no processo de EndMT. A ativação da via Notch, Wnt, TGF- β e o processo de hipóxia ocasionam a ativação de fatores de transcrição que resultam na transcrição de genes-alvo e conseqüentemente modulam a expressão gênica.

5.6 microRNAs (miRNAs)

Os mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos na indução ou progressão da EndMT, tais como os microRNAs (miRNAs) que são considerados como um potencial mecanismo regulatório no processo de EndMT.

Os miRNAs são pequenos RNAs endógenos não codificantes, filogeneticamente conservados e formados em média por 21 a 23 nucleotídeos (SHIVDASANI, 2006). Exercem um importante papel na regulação pós-transcricional, por meio da clivagem ou repressão da tradução dos RNA mensageiros (RNAm) alvos. Através deste mecanismo, os miRNAs regulam vários aspectos funcionais das células como proliferação, sobrevivência e apoptose (LEVA; CALIN; CROCE, 2006) e sua expressão aberrante tem sido intimamente associada com muitas doenças, incluindo tumorigênese e fibrose (DJURANOVIC; NAHVI; GREEN, 2011; DYKXHOORN, 2010; FABIAN; SONENBERG; FILIPOWICZ, 2010; JIANG et al., 2010; SMALL; OLSON, 2011; THIERY et al., 2009). Foi relatado que aproximadamente 20

a 30% dos genes humanos podem ser controlados pelos miRNAs (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005; XIE et al., 2005).

O papel funcional dos miRNAs na saúde e doença têm sido parcialmente elucidado e a literatura infere que os miRNAs provavelmente atuam como genes supressores de tumor ou oncogenes. Let-7, miR-335, miR-205, miR-206, miR-126, miR-146a e miR-101 foram identificados como supressores de metástase (GREGORY et al., 2008; TAVAZOIE et al., 2008; VARAMBALLY et al., 2008; YU et al., 2007). Em contrapartida, os miR-155, miR-10b, miR-21, miR-373 e miR-520c estão envolvidos na promoção de metástase e invasão tumoral pelo fato de regularem a EMT (HUANG et al., 2008; KONG et al., 2008; MA; TERUYA-FELDSTEIN; WEINBERG, 2007; YAN et al., 2008).

O papel dos miRNAs na indução da EMT tem sido evidenciado. É sabido que os miRNAs da família miR-200 (miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c e miR-429), bem como o miR-205 apresentam um importante papel na regulação da EMT associada a metástase (GREGORY et al., 2008). Ainda, Castilla e colaboradores (2011) analisaram a assinatura dos miRNAs associados à EMT em carcinosarcoma humano e descreveram 14 miRNAs diferencialmente expressos nas células mesenquimais quando comparados com as células epiteliais. Dentre esses, o miR-155 foi o mais expresso, indicando que este miRNA participa efetivamente do processo EMT (CASTILLA et al., 2011). Adicionalmente, a família do miR-30 está envolvida com a EMT de células epiteliais pancreáticas fetal humana e apresentam uma diminuição nos níveis de expressão durante a transição para células mesenquimais (JOGLEKAR et al., 2009).

Estudos descrevem o papel dos miRNAs em determinadas vias de sinalização referentes à EMT. Stinson e colaboradores (2011) relataram que a expressão dos miR-221/222 em células de câncer de mama diminui a expressão de E-caderina, aumenta a expressão do marcador vimentina e a capacidade de migração e invasão celular, uma característica essencial da EMT. Os pesquisadores ainda demonstraram que os miR-221/222 são positivamente regulados pela via de sinalização RAS-RAF-MEK-FOSL1 e promovem EMT pela ligação ao seu gene alvo, TRPS1, o qual reprime diretamente a transcrição de ZEB2. Como consequência do aumento dos miR-221/222, os níveis de expressão de ZEB2 são aumentados, ocasionando a repressão de E-caderina e estimulação de vimentina para promover EMT (STINSON et al., 2011).

Embora muitos trabalhos descrevam o papel dos miRNAs na EMT, poucos estudos analisam a expressão destas moléculas no processo de EndMT. Para avaliar a expressão de diversos miRNAs envolvidos no processo de EndMT, Ghosh e colaboradores (2012)

realizaram a técnica de *array* usando RNAs isolados de células endoteliais cardíacas e de células semelhantes a fibroblastos derivados de EndMT. Os resultados revelaram que a expressão dos miR-125b, let-7c, let-7g, miR-21, miR30b e miR-195 estavam elevadas durante a EndMT, ao passo que os níveis de expressão dos miR-122a, miR-127, miR-196 e miR-375 estavam diminuídos (GHOSH et al., 2012).

Os miRNAs também foram associados com a inibição de tumores. A expressão do miR-302c foi elevada nas células endoteliais de veia umbilical (HUVECs) e observou-se o aumento do marcador endotelial VE-caderina e diminuição dos marcadores mesenquimais FSP1 e α -SMA. Além disso, foi observado que o crescimento do carcinoma hepatocelular foi inibido quando co-cultivado com HUVECs superexpressando miR-302c. Entretanto, quando o miR-302c foi suprimido nas HUVECs, um resultado oposto foi obtido. Portanto, os dados sugerem que miR-302c pode inibir o crescimento de carcinoma hepatocelular por suprimir a EndMT (ZHU et al., 2014).

Conforme descrito anteriormente, vários mecanismos moleculares estão envolvidos com a indução da EMT. Entretanto, os processos relacionados com a indução da EndMT não estão totalmente esclarecidos. Postula-se que ambas EMT e EndMT compartilham os mesmos mecanismos moleculares. Neste contexto, o presente trabalho hipotetiza que o fator de transcrição *SNAIL*, bem como o fator de crescimento TGF- β 2, indutores da EMT, podem também induzir a EndMT em células endoteliais de diferentes fontes anatômicas alterando a biologia das CEs.

Objetivos



II. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os fatores indutores da EMT em células endoteliais de fontes distintas através da superexpressão do fator de transcrição *SNAIL* e do tratamento com TGF- β 2, bem como identificar os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo.

Objetivos Específicos

- Caracterizar as células endoteliais provenientes de localizações anatômicas distintas;
- Induzir a EndMT *in vitro* em linhagens de células endoteliais de fontes distintas pela superexpressão do fator de transcrição *SNAIL* e pelo tratamento com TGF- β 2;
- Avaliar as alterações morfológicas e no perfil de expressão gênica nas células endoteliais induzidas à EndMT;
- Gerar o perfil de expressão gênica global das células endoteliais que sofreram EndMT pela metodologia de *microarray*, bem como avaliar e validar os genes diferencialmente expressos;
- Avaliar as alterações no perfil de expressão de miRNAs nas células endoteliais que sofreram EndMT;
- Avaliar funcionalmente o papel do miRNA selecionado.

Materiais e Métodos

III. MATERIAIS E MÉTODOS

A estratégia experimental foi realizada de acordo com a Figura 4.

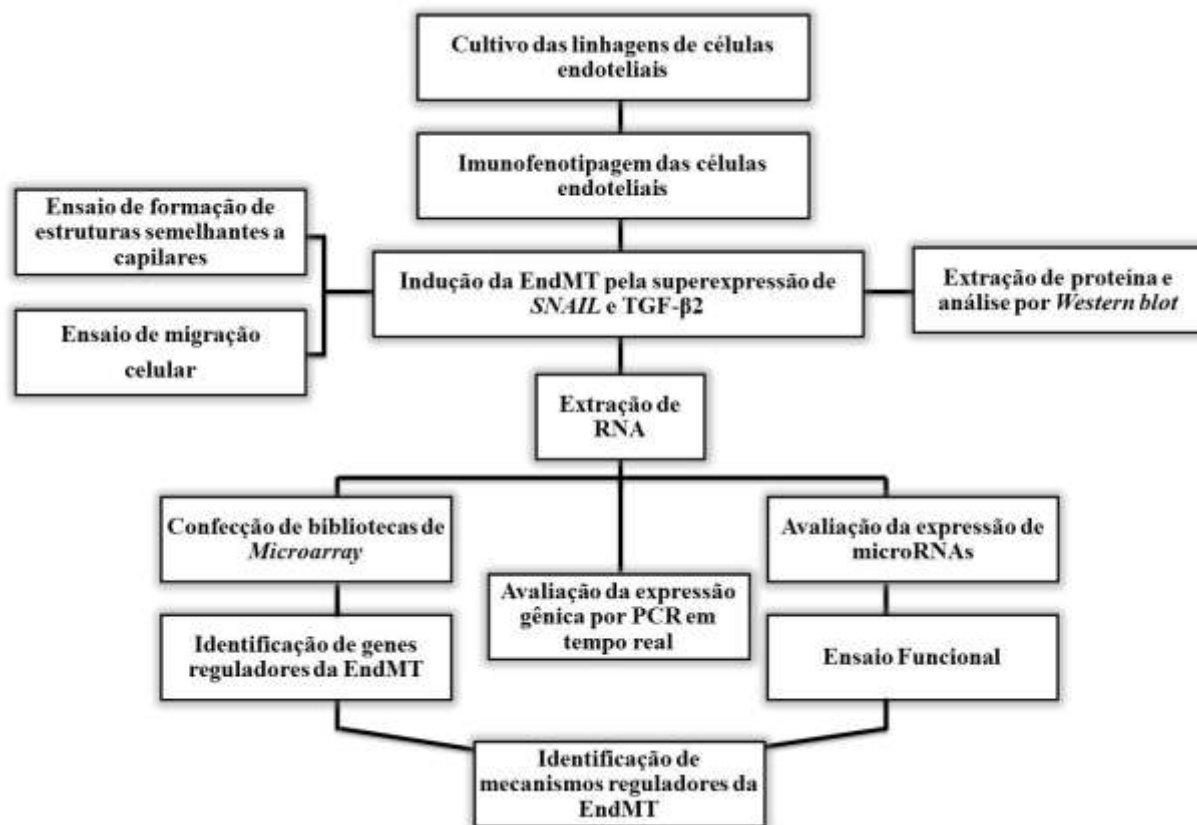


Figura 4. Fluxograma da estratégia experimental.

1. Cultivo e expansão das linhagens de células endoteliais (CEs)

As linhagens de células endoteliais utilizadas neste estudo foram adquiridas comercialmente da *American Type Culture Collection* (ATCC) e estão representadas na Tabela 1. As células endoteliais (CEs) foram cultivadas e expandidas em meio EGM2 (Lonza, EUA - CC-3162) contendo 2% de soro fetal bovino (SFB). Todas as células foram incubadas em 5% de CO₂ a 37°C.

Devido ao fato das células endoteliais serem aderentes ao plástico, a tripsina, uma enzima proteolítica, torna-se indispensável na coleta das células. As células foram submetidas à tripsinização ao atingirem 80-90% de confluência. O meio de cultivo das garrafas ou placas foi retirado e as células foram lavadas com PBS (1X). Em seguida, foi acrescentado 3 mL de tripsina (0,05%), incubou-se a 37°C por cinco minutos e na sequência, a tripsina foi inativada com 9 mL de PBS (1X) contendo 10% SBF (v/v). As células foram coletadas, transferidas para um tubo cônico (50 mL) e centrifugadas por 10 minutos a 200 x g. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o *pellet* foi homogeneizado e ressuspendido em meio EGM2 para contagem e novo plaqueamento.

Tabela 1. Linhagens celulares adquiridas comercialmente da *American Type Culture Collection* (ATCC).

Linhagens de Células Endoteliais	Código ATCC	Denominação
Pool de células endoteliais primárias de veia de cordão umbilical	PCS-110-013	PHUVEC
Linhagem de célula endotelial da artéria pulmonar	PCS-100-022	HPAEC
Linhagem de célula endotelial da aorta	PCS-100-011	PAEC
Linhagem de célula endotelial da artéria coronária	PCS-100-020	CAEC

2. Aspectos de Biossegurança

Este projeto se encontra aprovado pela Coordenação-Geral da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) em razão do uso de organismos geneticamente modificados (OGMs) da classe de risco NB-2 (Processo nº 297/2012.013-02) (Anexo I).

3. Imunofenotipagem das células por meio de citometria de fluxo

A expressão de marcadores de superfície foi quantificada por meio de citometria de fluxo utilizando-se o citômetro FACSCalibur (Becton & Dickinson, EUA). Para este experimento, foram utilizados anticorpos específicos contra as moléculas de interesse: CD13, CD14, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD49e, CD51/61, CD54, CD73, CD90, CD105, CD144, CD146 e CD166 (Becton & Dickinson, EUA). Um tubo com isotipo controle foi incluído no experimento. Cerca de 1×10^5 células foram incubadas com 5 μ L de cada anticorpo durante 15 minutos em temperatura ambiente e sob proteção de luz. A seguir, foi adicionado 1 mL de PBS (1X) para lavagem de anticorpos não ligados e os tubos foram centrifugados durante três minutos a 600 x g. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 200 μ L de PBS (1X) para a análise no citômetro de fluxo. Cerca de 10.000 eventos foram adquiridos e plotados em função dos parâmetros FSC (*forward scatter*) e SSC (*side scatter*).

4. Preparação do DNA plasmidial

4.1 Transformação de bactérias competentes

O fragmento de *SNAIL* clonado no vetor pLVX, bem como os plasmídeos acessórios pM2D-VSV-G, que codifica o envelope do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) e o pDR 8.91, que codifica o capsídeo viral, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Leonardo de Oliveira Rodrigues do laboratório do Prof. Robert A. Weinberg, Whitehead Institute, MIT, EUA. Esses vetores foram inseridos em bactérias competentes por transformação.

A uma alíquota de 60 μ L de bactérias competentes adicionou-se 2 μ L do DNA plasmidial e incubou-se no gelo durante cinco minutos. Em seguida, foi dado um choque térmico a 42°C por 45 segundos. Foram adicionados 60 μ L de meio LB líquido (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%) à reação de transformação. A solução foi semeada em placas contendo meio LB sólido (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%; ágar-ágar 1,5%) e ampicilina (concentração final 100 μ g/mL) e foram incubadas à 37°C *overnight*.

4.2 Cultura de bactérias em meio líquido

Após a transformação de bactérias competentes, foi coletada uma colônia

recombinante, inoculado a 5 mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina e incubado sob agitação de 180 rpm a 37°C por aproximadamente 8 horas.

4.3 Extração do DNA plasmidial

O DNA plasmidial das bactérias transformadas foi extraído a partir do kit *QIAfilter Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, Alemanha). As bactérias foram coletadas por centrifugação (6000 x g; 15 minutos; 4°C) e a seguir realizou-se a purificação de acordo com as orientações do fabricante.

4.4 Reação de digestão dos vetores com enzimas de restrição

A confirmação do inserto no vetor foi analisada por reação de digestão com enzimas de restrição. O DNA dos clones referentes ao fator *SNAIL* foi digerido com as enzimas *BamHI* e *XhoI* (Fast Digest® Fermentas, Canadá). O DNA dos clones 8.91 foi digerido com *EcoRI* e *BamHI* (Fast Digest®, Fermentas, Canadá), enquanto o DNA do VSVG foi digerido apenas com *EcoRI* (Fast Digest® Fermentas, Canadá). A reação de digestão foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e, em seguida, analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%.

5. Indução da EndMT por superexpressão de fator de transcrição *SNAIL*

5.1 Produção de lentivírus em células 293FT

Para a produção dos lentivírus, as células 293FT (Invitrogen, R700-07, EUA) foram plaqueadas em placas de 100 mm (4,0 x 10⁶ células/placa), com confluência de aproximadamente 80% e cultivadas em meio DMEM (Gibco, EUA) suplementado com 10% de SFB, aminoácidos não-essenciais (0,1 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL).

No dia seguinte, o meio de cultivo das células 293FT foi trocado adicionando-se 7 mL de DMEM 10% SFB. Em um tubo de polipropileno, adicionou-se 250 µL de meio DMEM sem adição de SFB e 20 µL de Lipofectamine™2000 (Invitrogen, EUA) e incubou-se durante cinco minutos em temperatura ambiente. Em outro tubo, foram adicionados 250 µL de meio DMEM sem adição de SFB, 1,5 µg do plasmídeo pDR 8.91, 0,5 µg do plasmídeo pM2D-VSV-G e 2,3 µg do plasmídeo contendo o gene de interesse, ou seja, os plasmídeos pLVX (Clontech, EUA) codificando o fator de transcrição *SNAIL* e a proteína verde fluorescente

GFP, como marcador para seleção. Ainda, foi utilizado um vetor pLVX vazio (*Empty*) como controle. Em todos os plasmídeos contendo os genes de interesse, a expressão está sob o comando do promotor CMV (Figura 5). Em seguida, o conteúdo dos dois tubos foi misturado e a solução foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo determinado, a solução foi adicionada à placa de cultura contendo as células 293FT por meio de gotejamento. Após seis horas da transfecção, o meio de cultivo foi trocado adicionando-se 7 mL de DMEM 10% SFB e as células foram incubadas em 5% de CO₂ a 37°C.

Após 48 horas da transfecção, o sobrenadante das células 293FT transfectadas e que continham os lentivírus foi coletado e adicionou-se novo meio de cultura na placa para nova coleta. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado em membrana de PVDF 0,45 μm e utilizado para a transdução das CEs. O mesmo procedimento foi repetido após 72 horas da transfecção.

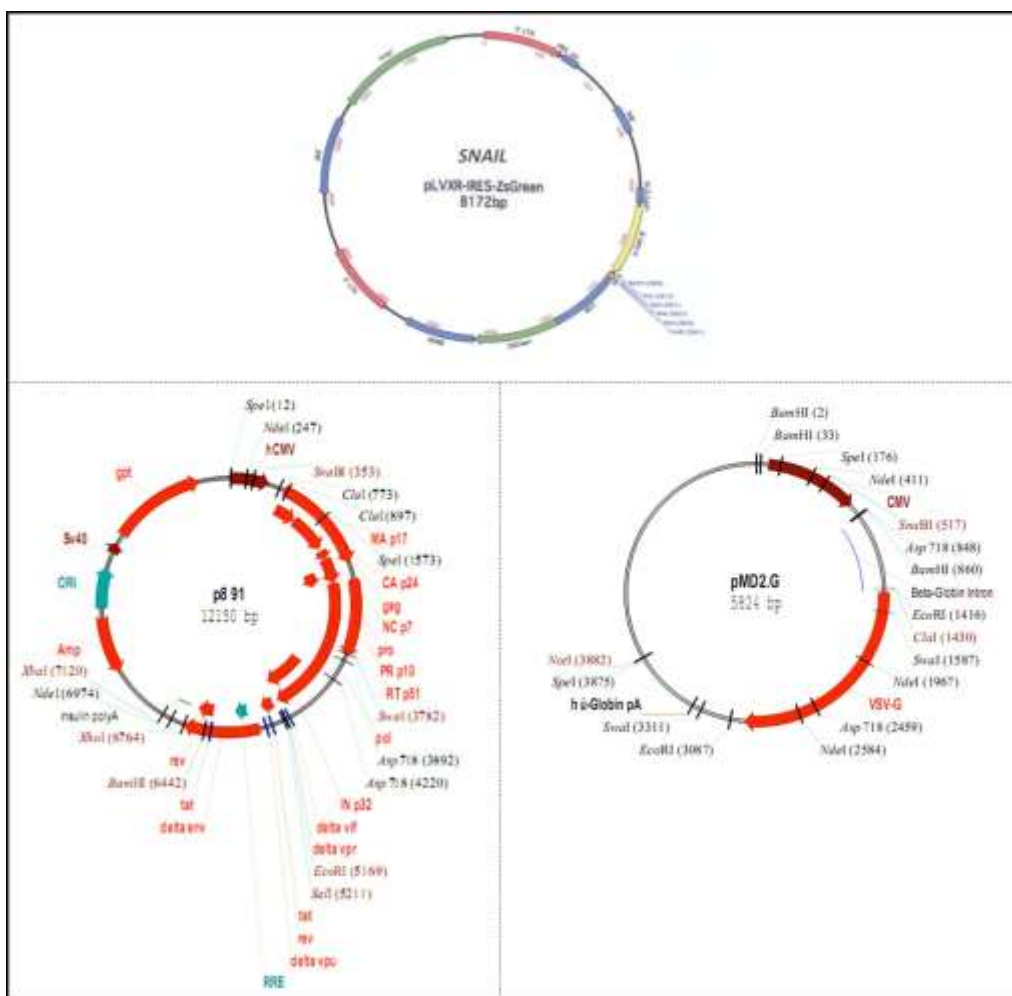


Figura 5. Mapa dos vetores utilizados para transfecção das células endoteliais. Mapa do vetor de expressão pLVXR, que contém o promotor CMV, o gene de interesse (*SNAIL*) seguido do elemento IRES e do gene repórter GFP; e mapa dos vetores auxiliares pDR 8.91, que codifica o capsídeo viral; e pM2D-VSVG, que codifica o envelope do vírus da estomatite vesical (VSVG).

5.2 Transdução das células endoteliais com lentivírus

Para a infecção das células endoteliais com os lentivírus gerados, as mesmas foram plaqueadas em placas de 100 mm (1×10^6 células/placa) no dia anterior ao experimento. Em seguida, o meio de cultivo foi removido e a transdução foi realizada adicionando-se o sobrenadante viral à placa, acrescido de polibreno (concentração final de 6,0 µg/mL). Após seis horas da transdução, o meio de cultivo foi trocado e as células foram incubadas em 5% de CO₂ a 37°C. Foram realizados dois ciclos de transduções, com tempo de incubação de 24 horas.

5.3 Cultivo das células transduzidas com *SNAIL* e tratadas com TGF-β2

Após as seis horas do segundo ciclo de transdução, o sobrenadante viral foi retirado e adicionou-se 6 mL de EGM2 sem adição de SFB para indução da EndMT. No dia seguinte, o meio foi novamente trocado e as células transduzidas com o fator de transcrição *SNAIL* foram cultivadas durante cinco dias.

As células transduzidas com o fator de transcrição *SNAIL* também foram associadas ao tratamento com TGF-β2. Após o segundo ciclo de transdução, o sobrenadante viral foi retirado, adicionou-se 6 mL de EGM2 sem adição de SFB e foi acrescentado 10 ng/mL de TGF-β2 (R&D Systems, EUA). No dia seguinte, o meio foi novamente trocado e adicionado 10 ng/mL de TGF-β2 e a indução foi realizada a cada 24 horas durante cinco dias.

Após cinco dias da transdução, a porcentagem da proteína verde fluorescente GFP foi avaliada por citometria de fluxo nas células transduzidas com *SNAIL* e com o vetor vazio *Empty*. Em caso da porcentagem de células GFP positivas ser menor que 90%, a seleção dessas células foi realizada por *sorting* celular (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*).

Como controle, as células endoteliais e as células transduzidas com o vetor vazio foram mantidas em meio EGM2 sem adição de soro por cinco dias. Todas as células foram incubadas em 5% de CO₂ a 37°C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Esses protocolos foram utilizados para avaliar as alterações morfológicas, bem como a expressão gênica e proteica. Para análise de expressão gênica, as células foram lavadas três vezes com PBS (1X), coletadas em 1 mL de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, EUA). Para análise de expressão proteica, as células foram lavadas três vezes com PBS (1X) e coletadas em 100 µL de RIPA *buffer* (Sigma, EUA) suplementado com inibidores de protease (*Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche, Suíça) e fosfatase (*PhosSTOP Phosphatase*

Inhibition, Roche, Suíça). Ambas as células coletadas em TRIzol[®] Reagent e em RIPA *buffer* foram armazenadas a -80°C.

6. Indução da EndMT pelo tratamento com TGF- β 2

Para a indução da EndMT com TGF- β 2, as CEs foram plaqueadas em placas de 100 mm (1 x 10⁶ células/placa) contendo o meio EGM2 com 2% SFB. Após confluência de 80-90%, o meio de cultivo foi removido, adicionou-se 6 mL de meio EGM2 sem adição de SFB e a indução foi realizada utilizando-se 10 ng/mL de TGF- β 2. No dia seguinte, o meio de cultivo foi novamente trocado e 10 ng/mL de TGF- β 2 foi adicionado. A indução foi realizada a cada 24 horas durante cinco dias. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Esse protocolo foi utilizado para avaliar as alterações morfológicas, bem como a expressão gênica e proteica. Para a análise de expressão gênica, as células foram lavadas três vezes com PBS (1X) e coletadas em 1 mL de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, EUA). Para análise de expressão proteica, as células foram lavadas três vezes com PBS (1X) e coletadas em 100 μ L de RIPA *buffer* (Sigma, EUA), suplementado com inibidores de protease e fosfatase (Roche, Suíça). Ambas as células coletadas em TRIzol[®] Reagent e em RIPA *buffer* foram armazenadas a -80°C.

7. Extração do RNA total

O RNA total das células endoteliais foi extraído pelo método do TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, EUA), seguindo instruções do fabricante.

A partir de aproximadamente 5 x 10⁶ células, foi adicionado 1 mL de TRIzol[®] e 100 μ g de glicogênio (USB, EUA). Posteriormente, foi adicionado 250 μ L de clorofórmio (Merck, Alemanha) e agitou-se em vórtex por 15 segundos. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante cinco minutos a 4°C. Após a centrifugação, a reação foi separada em três fases: a fase aquosa, que contém o RNA, seguida da interface e fase fenol-clorofórmio. A fase aquosa foi separada e transferida para um novo tubo onde se adicionou 500 μ L de isopropanol gelado (Merck, Alemanha) e incubou-se *overnight* a -20°C para precipitação do RNA. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Após desprezar o sobrenadante, foram adicionados 500 μ L de etanol 70% (v/v) gelado no precipitado para lavagem, seguido de centrifugação a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O precipitado, após secagem em tubo aberto durante 15 minutos, foi ressuscitado em 20 μ L

de água DEPC, tratada com dietil pirocarbonato e estocado a -80°C .

O RNA foi avaliado quanto à integridade e pureza por meio da análise em gel de agarose 1% (Invitrogen, EUA), bem como quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Scientific, EUA) no comprimento de onda de 260 nm, considerando-se que 1 OD₂₆₀ (densidade ótica) é igual a 40 µg/mL.

8. Reação de transcrição reversa

O RNA total foi reversamente transcrito em DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, EUA), segundo as instruções do fabricante.

Para um volume final de 25 µL, foram utilizados 2,5 µL de tampão RT (10X); 2,0 µL de mix de dNTP (100 mM); 2,5 µL *random primers* (10X); 0,075 µL de *RNAse out*; 1,25 µL da enzima *MultiScribe[®] MuLV reverse transcriptase*, 1 µg de RNA e água livre de RNase para ajuste do volume final. A reação foi incubada no termociclador e submetida à temperatura de 25°C durante 10 minutos, seguida de 37°C durante duas horas.

Após a transcrição, o cDNA foi diluído 1:3 em água deionizada estéril e estocado a temperatura de -20°C . Posteriormente, foi utilizado nas reações para análise de expressão gênica.

9. Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Os genes relacionados com a EndMT tiveram sua expressão quantificada por PCR quantitativo em tempo real utilizando o método TaqMan[®] (Applied Biosystems, EUA).

O sistema TaqMan[®] consiste em uma sonda que apresenta em uma extremidade, um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher*. Durante a qPCR, a sonda TaqMan[®] se hibridiza com a sequência de DNA complementar alvo para a amplificação. À medida que ocorre a amplificação, a sonda é degradada devido a atividade 5'→3' exonuclease da enzima *Taq polimerase*. Com isso, a sonda emite fluorescência, no qual é captada pelo equipamento *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EUA).

Na reação foram utilizados 5,0 µL de *TaqMan[®] Universal PCR Master Mix* (2X); 0,5 µL de sonda gene-específica (20X); 2,0 µL de cDNA diluído 1:3 (v/v) e água livre de RNase para um volume final de 10 µL. A reação foi submetida aos ciclos de amplificação: um ciclo de 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos/ 60°C por 1 minuto.

Os genes avaliados neste trabalho foram: *snail homolog 1 (SNAIL)* (Hs00195591_m1),

fibronectin 1 (FNI) (Hs01549976_m1), *S100 calcium binding protein A4 (FSP1)* (Hs00243202_m1), *actin, alpha 2, smooth muscle (α -SMA)* (Hs00909449_m1), *Thy-1 cell surface antigen (CD90)* (Hs00174816_m1), *cadherin 2, type 1 (N-caderina/CDH2)* (Hs00983056_m1), *Smooth muscle protein 22-alpha (SM22)* (Hs00162558_m1), *calponin 1 (CNN1)* (Hs00154543_m1), *cadherin 5, type 2 (VE-caderina/CDH5)* (Hs00174344_m1), *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM/CD31)* (Hs00169777_m1), *keratin 19, type I (KRT19)* (Hs00761767_s1), *collagen, type I, alpha 1 (COL1A1)* (Hs00164004_m1), *collagen, type I, alpha 2 (COL1A2)* (Hs00164099_m1), *NOTCH3* (Hs00166432_m1), *Catenin, beta 1 (β -CATENINA)* (Hs00355045_m1), *wingless-type MMTV integration site family, member 5B (WNT5B)*. Todas as reações foram realizadas em duplicata e conduzidas no equipamento 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems, EUA).

O nível da expressão gênica foi calculado por meio dos valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos e a normalização da reação foi feita pela média geométrica dos genes endógenos β -actina (*ACTB*) (4326315E) e *GAPDH* (4310884E). Em seguida, o cálculo da expressão relativa foi realizado utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001).

Após a obtenção dos níveis de expressão, o *software* Genesis 1.75, desenvolvido por Sturn (2000), foi utilizado para as análises de agrupamento *k-means* a fim de identificar genes que compartilhavam os mesmos níveis transcricionais (STURN, 2000).

9.1 Análises estatísticas

Os resultados da expressão gênica foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando-se estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). O programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, EUA) foi utilizado para realizar todas as análises estatísticas.

10. Análise da expressão proteica por *Western blot* (WB)

10.1 Preparo das amostras

As amostras que foram previamente coletadas em RIPA *buffer* e armazenadas a -80°C foram descongeladas em gelo. Após descongelamento, as mesmas foram centrifugadas a $18.000 \times g$ durante cinco minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A concentração das proteínas foi quantificada pelo método de BCA usando o kit *BCATM*

Protein Assay kit (Thermo Scientific, EUA), conforme instruções do fabricante. A leitura foi realizada no equipamento *SpectraMax M5* (Bio-Rad, EUA).

Após a quantificação das proteínas, as amostras foram usadas em concentrações de 20-40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e adicionou-se 10 μL do tampão de amostra *NuPAGE LDS Sample Buffer 4x* (Invitrogen, EUA). Para avaliar o peso molecular das proteínas, utilizou-se 20 μL do marcador *Kaleidoscope™ Prestained Standards* (Bio-Rad, EUA).

10.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Foi realizada eletroforese SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) em tampão Tris-glicina (Bio-Rad, EUA) e gel de poliacrilamida na concentração de 10% para a separação das proteínas a serem analisadas. Os géis foram adquiridos comercialmente pela Bio-Rad (*Mini-PROTEAN TGX Gels*, Bio-Rad, EUA). As amostras foram submetidas à eletroforese a corrente elétrica de 100 volts (V) durante 30 minutos iniciais e após esse período, a 150 V durante uma hora.

10.3 Transferência da amostra para membrana de nitrocelulose

As proteínas presentes no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (*Hybond-C Extra*, Amersham Biosciences, Reino Unido). No sistema de transferência, o gel e a membrana foram posicionados, juntamente com papel filtro e esponjas umedecidas em tampão de transferência (bicarbonato de sódio 0,22%, Sigma, EUA). Em seguida, o sistema foi posicionado em uma cuba e a mesma foi mantida em isopor com gelo para evitar superaquecimento. A transferência foi realizada a 35 V durante uma hora.

Para certificar a eficiência da transferência, a membrana foi corada com *ATX Ponceau S red staining solution* (Sigma, EUA) seguida de descoloração em TBS-T. A presença de bandas homogêneas de proteínas na membrana indicava uma transferência eficiente.

10.4 Bloqueio da membrana

Após a transferência das proteínas dos géis para as membranas, foi realizado o bloqueio das mesmas a fim de impedir as reações inespecíficas entre as proteínas das membranas e o anticorpo utilizado para detecção da proteína alvo. O bloqueio foi realizado por uma hora, com agitação, usando uma solução de 5% de leite desnatado em pó (*Blotting*

Grade Blocker, Bio-Rad, EUA) em TBS-T (Tris-base 0,25% (p/v); NaCl 0,8%; Tween 0,1%, pH 7,6). Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T por três vezes durante cinco minutos.

10.5 Marcação com anticorpo primário e secundário

Foi preparada uma diluição do anticorpo primário na concentração de 1:1000 em 5% de BSA em TBS-T ou em 5% de leite desnatado em pó em TBS-T, de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário *overnight* a 4°C, sob agitação. Foram analisadas as expressões das seguintes proteínas: CD31 (Cell Signaling Technology #3528, EUA), CDH5 (Cell Signaling #2158, EUA), SM22 (Abcam - ab14106, Reino Unido), SNAIL (Cell Signaling #3895, EUA) e COL1A1 (Abcam - ab34710, Reino Unido). O anticorpo GAPDH (Cell Signaling #2118, EUA) foi utilizado como controle endógeno.

Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBS-T por três vezes durante 10 minutos e marcadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG ligado à peroxidase (GE Healthcare Amersham, Suécia) ou anti-mouse IgG ligado à peroxidase (GE Healthcare Amersham, Suécia) na diluição de 1:2000 em 5% de leite desnatado em pó em TBS-T. A reação foi incubada por uma hora e após essa etapa, as membranas foram lavadas com TBS-T por três vezes durante 10 minutos.

A revelação de todas as membranas foi realizada por meio de quimioluminescência com a adição de substrato quimioluminescente *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare Amersham, Suécia), conforme as recomendações do fabricante. O excesso da solução contendo substrato foi removido e as membranas foram expostas e fotografadas no aparelho ImageQuant™ LAS 4000 mini (GE Healthcare Amersham, Suécia).

11. Análise de expressão gênica global pelo método de *microarray*

A técnica de *microarray* surgiu em meados da década de 1990 (SCHENA et al., 1995; SHALON; SMITH; BROWN, 1996) e permite mensurar os níveis de expressão de milhares de genes simultaneamente. Esse método consiste basicamente na propriedade de hibridização por complementariedade dos ácidos nucleicos e no fato de pequenos oligonucleotídeos estarem presentes na lâmina de *microarray* e apresentarem sequências complementares às sequências do RNA mensageiro (CHEUNG et al., 1999; DALMA-WEISZHAUSZ et al.,

2006).

A análise do perfil de expressão gênica global das CAECs após a indução da EndMT foi realizada por meio da plataforma comercial Agilent® de *microarrays* de oligonucleotídeos utilizando o kit *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Low Input Quick Amp Labeling)* (G4851B - Agilent Technologies, EUA).

11.1 Seleção das amostras

Foram selecionadas 14 amostras para a realização dos *microarrays*: três amostras das CAECs controles (CT); três CAECs tratadas com TGF-β2; duas amostras das CAECs transduzidas com o vetor *Empty*; três CAECs transduzidas com o vetor *SNAIL*; e três CAECs transduzidas com o vetor *SNAIL* e associadas ao tratamento com TGF-β2.

11.2 Preparação dos *Spikes*

Para garantir a qualidade da técnica de *microarray* são utilizados controles positivos, denominados *spikes*. Estes são sequências de RNA responsáveis por monitorar todo experimento, desde a amplificação da amostra até a marcação e o processamento dos dados.

Inicialmente, o tubo contendo o estoque dos *spikes* foi aquecido a 37°C durante cinco minutos e o tampão de diluição foi aquecido a 80°C durante três minutos. Em seguida, foram feitas três diluições: 1:20 (2,0 µL da solução estoque + 38,0 µL de tampão de diluição); 1:25 (2,0 µL da primeira diluição + 48,0 µL de tampão de diluição); 1:10 (4,0 µL da segunda diluição + 36,0 µL de tampão de diluição). As amostras foram homogeneizadas entre as diluições.

11.3 Reação de marcação

Para a marcação das amostras, o volume do RNA foi acertado com água livre de RNase para um volume de 1,5 µL em tubos de 0,5 µL mantendo a concentração de 200 ng/µL. Em seguida, foram adicionados 2,0 µL de *spike* (terceira diluição), 0,8 µL de *primer* promotor T7 e 1 µL de água livre de RNase, totalizando um volume de 5,3 µL. A reação foi incubada a 65°C durante 10 minutos para a desnaturação dos *primers* e das amostras. Em seguida, incubou-se durante cinco minutos em gelo.

A reação de transcrição reversa foi realizada acrescentando aos tubos 2,0 μL de tampão de primeira fita (5X), 1,0 μL de ditioneitol 0,1M (DTT), 0,5 μL de mix de dNTP (10 mM), 1,2 μL do reagente *Affinity Script RNase Block Mix*. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 40°C durante duas horas e 70°C durante 15 minutos. Após incubação, as amostras foram armazenadas a -80°C por 24 horas.

A reação de marcação do cRNA foi realizada adicionando aos tubos 0,75 μL de água livre de RNase, 3,2 μL de tampão de transcrição (5X), 0,6 μL de DTT a 0,1M, 1,0 μL de mix de NTP, 0,21 μL da enzima RNA polimerase T7 e 0,24 μL de CTP marcada com cianina (Cyanine 3-CTP). Incubou-se a 40°C durante duas horas. Ao fim da marcação, as amostras foram submetidas à purificação (RNA *cleanup*).

11.4 RNA Cleanup

O volume das amostras de cRNA tiveram o volume acertado para 100 μL e as mesmas foram submetidas à purificação usando o kit *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Alemanha).

Inicialmente, adicionou-se 350 μL de tampão RLT, homogeneizou-se bem e acrescentou-se 250 μL de etanol. O volume total foi transferido para a coluna *RNeasy mini spin* e centrifugou-se a 13.000 rpm durante 30 segundos. Em seguida, o eluído foi desprezado e adicionou-se 500 μL do tampão RPE. A coluna foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e novamente o eluído foi descartado. Outra vez, o tampão RPE foi adicionado e centrifugou-se 13.000 rpm durante um minuto. O eluído foi descartado e centrifugou-se a 13.000 rpm durante 30 segundos para garantir que todo o tampão RPE foi desprezado. Adicionalmente, a coluna foi transferida para um tubo *ependorf* de 1,5 mL e acrescentou-se 30 μL de água livre de RNase para eluição do cRNA retido na coluna. A coluna foi incubada por um minuto em temperatura ambiente e centrifugada a 13.000 rpm durante 30 segundos. O cRNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro.

11.5 Quantificação do cRNA

A incorporação do fluorocromo cianina foi quantificada no equipamento NanoDrop (NanoDrop, Thermo scientific, EUA). Foram determinados os seguintes parâmetros: concentração do fluorocromo cianina 3 (pmol/ μL) e concentração de cRNA (ng/ μL). A quantidade total de cRNA e a atividade específica da cianina foram calculadas pelas seguintes fórmulas:

$$\text{Quantidade total de cRNA } (\mu\text{g}) = \frac{[\text{cRNA}] \times 30}{1.000}$$

$$\text{Atividade específica da cianina (pmol Cy3}/\mu\text{g RNA)} = \frac{[\text{cianina}]}{[\text{cRNA}]} \times 1.000$$

É esperado que o cRNA apresente quantidades maiores que 600 ng e para atividade específica da cianina valores acima de 6,0 pmolCy3/ μ g cRNA.

11.6 Hibridização

A reação de hibridização foi realizada adicionando-se a um tubo de 1,5 mL: 600 ng de cRNA, 5,0 μ L de agente bloqueador (10X), 1,0 μ L de tampão de fragmentação (25X) e água livre de RNase para um volume final de 25,0 μ L. Após incubação a 60°C durante 30 minutos para a fragmentação do cRNA, as amostras foram colocadas no gelo durante um minuto e acrescentou-se 25 μ L de tampão de hibridização Hi-RPM GEx (2X).

As lâminas de *microarray* foram hibridizadas com o auxílio de uma lâmina vedadora denominada *gasket* e uma câmara de hibridização nomeada *chamber*. A *gasket* foi posicionada na *chamber* e as amostras foram adicionadas lentamente no centro dos poços da *gasket*. Em seguida, após a lâmina de *microarray* ser colocada invertida sobre a *gasket*, a *chamber* foi fechada e incubou-se em forno de hibridização a 65°C, durante 17 horas, 10 rpm.

11.7 Lavagem das lâminas de *microarray*

As lâminas de *microarray* devem ser lavadas após a hibridização para assim serem escaneadas. Foram preparadas cinco cubas para a lavagem, duas contendo o tampão de lavagem 1, uma cuba contendo tampão de lavagem 2 aquecido a 37°C, uma contendo acetonitrila e outra contendo solução de estabilização e secagem. Posteriormente, a *chamber* foi retirada do forno e após ter sido aberta, a *gasket* foi removida com lâmina de *microarray* e transferiu-se para a primeira cuba. Em seguida, a lâmina de *microarray* foi transferida para a

segunda cuba e agitou-se por um minuto no agitador magnético. A lâmina foi transferida para a terceira cuba que continha o tampão 2 e agitou-se nas mesmas condições anteriores. Ainda, a lâmina foi transferida e incubada na quarta cuba contendo acetonitrila durante 10 segundos, seguida da incubação na quinta cuba contendo a solução de estabilização e secagem durante 30 segundos. Finalmente, a mesma foi retirada da cuba, armazenada ao abrigo da luz e escaneada imediatamente.

11.8 Escaneamento das lâminas de *microarray*

As lâminas foram escaneadas usando o equipamento *Agilent Microarray Scanner* (Agilent Technologies, EUA). Os dados foram analisados através do *software Agilent feature extraction* versão 10.7.3 (Agilent Technologies, EUA).

Este *software* permite o reconhecimento dos *spots*, que são pontos específicos nos quais estão aderidos os oligonucleotídeos. Em seguida, é gerado um relatório com diversos parâmetros que estão relacionados com a qualidade dos *microarrays*.

11.9 Análise dos resultados

Após o escaneamento e a quantificação da intensidade de fluorescência de cada *spot* realizou-se a normalização dos *microarrays* com o objetivo de tornar as diferentes lâminas comparáveis entre si. O controle de qualidade, a normalização e os parâmetros utilizados para filtrar os dados dos *microarrays* foram realizados utilizando o conjunto de algoritmos contidos no pacote Limma, disponível em <http://bioconductor.org/>.

A expressão diferencial de genes individuais foi analisada com o teste t moderado de um modelo linear e um método Bayesiano empírico implementado no pacote Limma. Em seguida, o teste Benjamini-Hochberg de correção de múltiplas hipóteses foi aplicado gerando o *p* valor ajustado. Os diferentes grupos (CT, *Empty*, TGF- β 2, *SNAIL*, *SNAIL*+TGF- β 2) foram comparados entre si e os genes que possuíam \log_{10} *fold change* > 2 e *p* valor ajustado < 0,005 foram selecionados.

Após a seleção dos genes diferencialmente expressos, foi realizada a categorização funcional com a finalidade de avaliar o papel biológico dos mesmos. Dessa forma, foram utilizadas as informações providas da plataforma de análises online *Ingenuity Pathway Analysis* (Ingenuity System Inc., Redwood City, Califórnia, EUA).

12. Ensaio de formação de estruturas semelhantes a capilares em Matrigel®

A matriz de membrana basal Matrigel® é uma preparação de membrana basal solubilizada, extraída do sarcoma de rato Engelbreth-Holm-Swarm, um tumor rico em proteínas de matriz extracelular. A matriz Matrigel® em temperatura ambiente polimeriza-se para produzir material de matriz biologicamente ativo semelhante à matriz basal celular dos mamíferos. Ainda, o Matrigel® é eficaz na diferenciação e na ancoragem de células endoteliais. Dessa forma, o uso do mesmo permite a análise da angiogênese por meio da formação de estruturas semelhantes a capilares.

O Matrigel® foi armazenado a -20°C. Entretanto, para iniciar o ensaio o mesmo foi mantido em geladeira por, no mínimo, seis horas para se tornar líquido. Em uma placa de 24 poços, foram adicionados 350 µL Matrigel® na concentração de 9,8 mg/mL em cada poço. Em seguida, a placa foi mantida por, no mínimo, 30 minutos em estufa a 37°C para a polimerização do Matrigel®.

Após o tempo determinado, 1×10^5 células CAEC induzidas à EndMT (controle, *Empty*, TGF-β2, *SNAIL* e *SNAIL*+TGF-β2) obtidas no item 5 e 6, foram ressuspendidas em 650 µL do meio de cultivo EGM2 sem adição de SFB e adicionadas ao poço da placa contendo Matrigel®. As células foram mantidas em 5% de CO₂ a 37°C e após 24 horas de incubação, foram observadas ao microscópio óptico invertido e fotografadas para o monitoramento da formação de estruturas semelhantes a capilares.

13. Ensaio de migração celular (*scratch assay*)

Para avaliar a motilidade das CAECs após a indução da EndMT realizou-se o ensaio de migração.

As CAECs foram plaqueadas em placas de seis poços (1×10^5 células/poço). Em seguida, realizou-se a transdução com o fator de transcrição *SNAIL* e com o vetor vazio (*Empty*), conforme descrito no item 5, bem como o tratamento com TGF-β2 (item 6). Após os cinco dias de indução foi realizado um traço na monocamada de células com o auxílio de uma ponteira estéril pressionada contra o assoalho da placa de cultura, formando uma fenda na camada de células. O meio foi trocado para a retirada completa de debris celulares. O mesmo procedimento foi realizado para as células plaqueadas para indução com TGF-β2 e usadas como controle. A indução com TGF-β2 foi realizada com 10 ng/mL. Todas as células foram mantidas em 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas.

O processo foi fotografado em três regiões distintas do traço realizado em cada poço da

placa e as imagens fotográficas foram capturadas no início do experimento (tempo zero hora) e após 24 horas da indução da EndMT. As espessuras iniciais e finais foram mensuradas em cinco pontos diferentes do traço usando o *software* ImageJ (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004). Em seguida, estimou-se a porcentagem da migração ($= [1 - \text{espessura final} / \text{espessura inicial}] \times 100$).

As análises estatísticas dos resultados obtidos no ensaio de migração foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EUA) usando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando-se estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

14. Análise da expressão dos microRNAs (miRNA)

14.1 Reação de Transcrição Reversa – miRNA

Para quantificar a expressão dos miRNAs foi realizado uma qPCR usando *primers stem-loop* RT-PCR específicos para cada miRNA estudado.

Para um volume final de 7,5 μL , foram utilizados 0,75 μL de tampão RT (10X); 0,075 μL de mix de dNTP (100 mM); 0,094 μL de *RNAse out*; 0,5 μL da enzima *MultiScribe*[®] *MuLV reverse transcriptase*, 2,5 ng de RNA. O *random primer*[®] (Applied Biosystems, EUA) foi substituído pelo *stem-loop RT primer*[®] para cada miRNA maduro analisado. Em seguida, o volume foi ajustado com água livre de RNase e a reação foi incubada no termociclador e submetida à temperatura de 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por cinco minutos.

Após a transcrição, o cDNA-miRNA foi diluído 1:4 em água deionizada estéril e estocado -20°C. Posteriormente, estas amostras foram utilizadas nas reações para análise de expressão dos miRNAs.

14.2 Análise da expressão dos miRNAs por PCR quantitativa (qPCR)

Os miRNAs tiveram sua expressão quantificada por PCR quantitativa em tempo real utilizando o método TaqMan[®] (Applied Biosystems, EUA).

Para essa reação, foram utilizados 5 μL do reagente *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix*; 0,5 μL de sonda (específica para cada microRNA maduro); 0,5 μL de água livre de RNase; 4,0 μL cDNA-miRNA obtido no item anterior diluído 1:4 (v/v). Todas as reações de amplificação foram realizadas em duplicata e conduzidas no equipamento *7500 Real Time*

PCR (Applied Biosystems, EUA).

Os miRNAs avaliados neste trabalho foram: miR-let7a, miR-10a, miR-26a, miR-29a, miR-34a, miR-125b, miR-145, miR-146a, miR-200b, miR-200c, miR-221 e miR-222. O nível da expressão dos miRNAs foi calculado através dos Ct (*cycle threshold*) obtidos e a normalização da reação foi feita pelo endógeno RNU48. Posteriormente, o cálculo da expressão relativa foi realizado utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001).

14.3 Ensaio de perda e ganho de função

A fim de avaliar o papel do miR-let7a na indução da EndMT, foi realizado o ensaio de perda e ganho de função utilizando o *kit mirVanaTM miRNA mimics* (Ambion, EUA). Esse *kit* contém oligonucleotídeos capazes de mimetizar (*mimics*) ou inibir a função de um miRNA específico.

Inicialmente as CAECs foram plaqueadas em placas de seis poços (1×10^5 células/poço) e transduzidas com o fator de transcrição *SNAIL* e com o vetor vazio (*Empty*), conforme protocolo descrito no item 5. No dia seguinte da transdução, as células transduzidas com *SNAIL* e *Empty*, bem como as células plaqueadas para controle e indução com TGF- β 2, foram submetidas à transfecção com miR-let7a *mimics*, também denominados pré-miRNA e, com inibidor, anti-miRNA.

Em um tubo de polipropileno, adicionou-se 50 μ L de meio EGM2 sem adição de SFB e 5 μ L de LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, EUA) e incubou-se durante cinco minutos em temperatura ambiente. Em outro tubo, foram adicionados 50 μ L de meio EGM2 sem adição de SFB e 50 nM do pré ou anti-miR-let7a. Em seguida, o conteúdo dos dois tubos foi misturado e a solução foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo determinado, o meio de cultivo de cada poço foi trocado adicionando-se 1,5 mL de EGM2 2% SFB e a solução foi acrescentada à placa de cultura. Após seis horas da transfecção dos miRNAs, o meio de cultivo foi trocado adicionando-se 2 mL de EGM2 sem adição de SFB e as células foram incubadas em 5% de CO₂ a 37°C. A indução com 10 ng/mL de TGF- β 2 foi realizada a cada 24 horas. A expressão gênica e do miR-let7a foi avaliada com 24 horas e 48 horas após a transfecção.

14.4 Análises estatísticas

Os resultados da expressão dos miRNAs foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis por meio do programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, EUA). As diferenças foram estatisticamente significantes quando o *p* foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

Resultados



IV. RESULTADOS

1. Caracterização imunofenotípica das células endoteliais

Após o cultivo e expansão das linhagens endoteliais PHUVEC, HPAEC, PAEC e CAEC, as mesmas foram imunofenotipadas por meio de citometria de fluxo. A análise imunofenotípica foi realizada a fim de detectar a presença de marcadores típicos de células endoteliais, bem como a ausência de marcadores específicos de outras células. Conforme observado na tabela 2, as células endoteliais expressaram pouco (<20%) antígeno hematopoético (CD34, CD45 e CD14) e mesenquimal (CD90), entretanto expressaram altos níveis (>50%) dos marcadores que caracterizam as células endoteliais, tais como CD13, CD29, CD31, CD44, CD49e, CD51/61, CD54, CD73, CD105, CD144, CD146 e CD166.

Tabela 2. Imunofenotipagem das células endoteliais.

Marcadores	PHUVEC	HPAEC	CAEC	PAEC
CD13	99	100	100	98
CD14	6	4	1	5
CD29	100	100	100	100
CD31	85	95	93	93
CD34	14	3	13	19
CD44	51	55	87	72
CD45	0	0	0	2
CD49e	99	98	99	99
CD51/61	59	65	62	74
CD54	39	73	71	63
CD73	77	96	91	94
CD90	8	3	4	3
CD105	99	99	99	98
CD144	78	85	73	63
CD146	82	92	94	89
CD166	78	84	89	86

PHUVEC: *Pool* de células endoteliais primárias de veia de cordão umbilical; HPAEC: Linhagem de célula endotelial da artéria pulmonar; CAEC: Linhagem de célula endotelial da artéria coronária; PAEC: Linhagem de célula endotelial da aorta.

2. Indução das células endoteliais pela superexpressão do *SNAIL* e pelo tratamento com TGF- β 2

2.1 Análise morfológica das células endoteliais induzidas à EndMT

A EndMT foi induzida nas células endoteliais PHUVEC, HPAEC, PAEC e CAEC pela transdução do fator de transcrição *SNAIL*, bem como pelo tratamento com TGF- β 2. Em seguida, as alterações morfológicas e moleculares foram avaliadas com o objetivo de avaliar a modulação gênica que a indução de *SNAIL* e TGF- β 2 suscita nas células.

Conforme observado na Figura 6, as células PHUVEC e PAEC transduzidas com *SNAIL* e associadas ao tratamento com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2) apresentaram alterações morfológicas, demonstrando formato fibroblastoide, o qual é típico de célula mesenquimal, quando comparado com as células controles e transduzidas com o vetor vazio (*Empty*). Ainda, as células CAEC transduzidas com *SNAIL* também apresentaram alteração morfológica, condizente com morfologia fusiforme. Entretanto, essa alteração foi mais evidente nas células CAEC *SNAIL*+TGF- β 2. Nenhuma alteração foi observada na morfologia das células HPAEC.

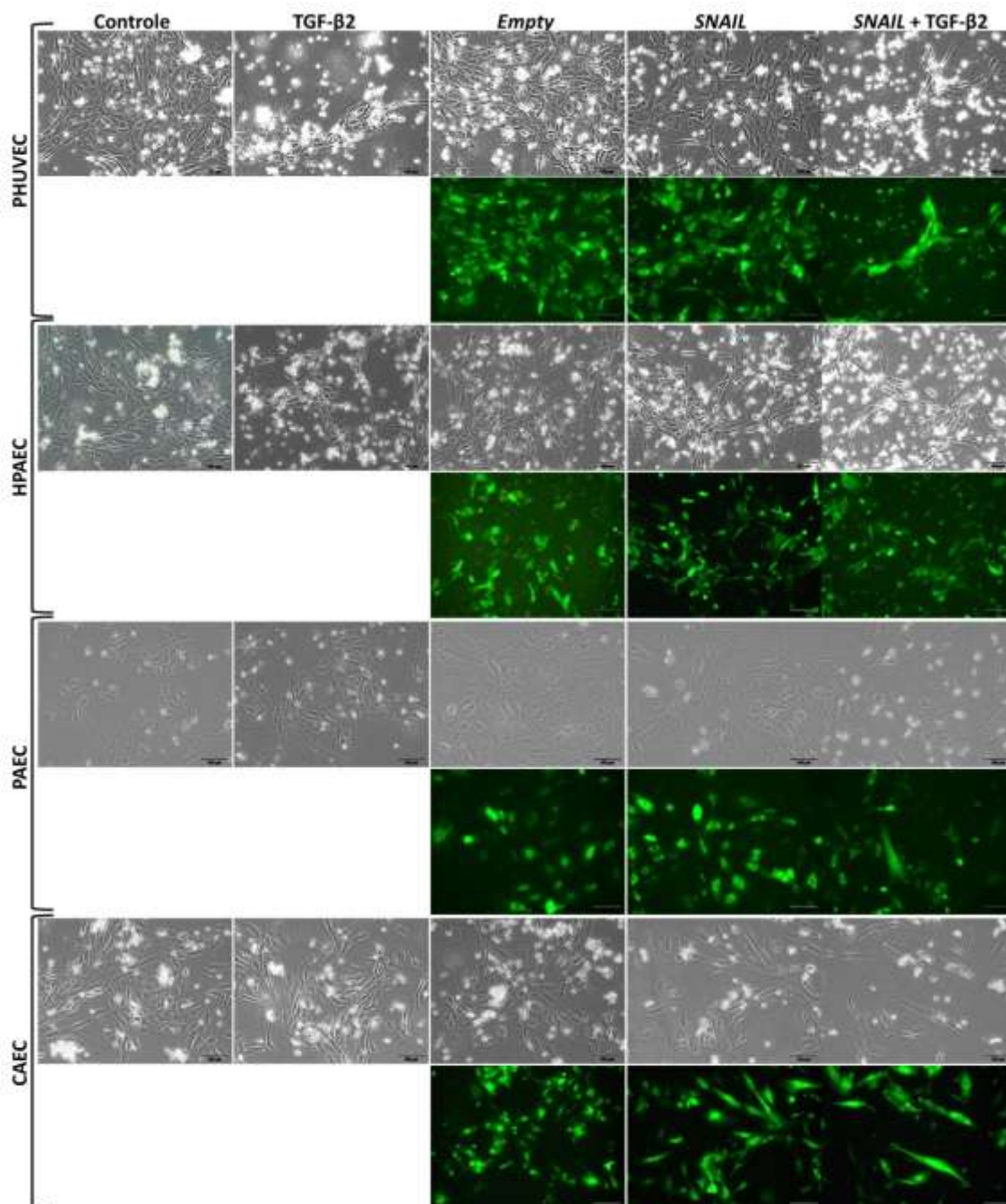


Figura 6. Morfologia das células PHUVEC, HPAEC, PAEC e CAEC durante a indução da EndMT pela superexpressão do fator de transcrição *SNAIL* associado ou não ao tratamento com TGF- β 2. As células transduzidas com o vetor vazio (*Empty*) e com *SNAIL* apresentaram expressão da proteína reporter GFP. As imagens foram obtidas em contraste de fase e por epifluorescência das células GFP positivas no aumento de 20x após cinco dias de indução.

2.2 Análise da expressão gênica das células endoteliais induzidas à EndMT

A expressão de genes relacionados ao processo EndMT foi quantificada pela metodologia qPCR, utilizando as células controle mantidas em EGM2 sem SFB como calibrador. As PHUVECs apresentaram um aumento significativo na expressão dos marcadores mesenquimais *FNI* (3,6x) e *CNN1* (7,4x) nas células *SNAIL*+TGF- β 2 comparado com controle e *Empty*, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 7). Observou-se uma maior expressão de *SM22* (5,4x) e *CDH2* (9,2x) nas células tratadas somente com TGF- β 2 quando comparadas com as transduzidas com *SNAIL* ($p < 0,05$). As células transduzidas com *SNAIL* exibiram um aumento significativo de *CD90* (4,0x) comparado com as células transduzidas com o vetor *Empty* ($p < 0,05$).

As HPAECs demonstraram um aumento dos marcadores mesenquimais entre os variados grupos de indução. Foi observado um aumento significativo de *SM22* (2,6x) nas HPAECs tratadas com TGF- β 2 comparado com as células transduzidas com *SNAIL* ($p < 0,05$) (Figura 8). Ainda, a expressão de *CNN1* estava significativamente elevada (11,2x) nas células *SNAIL*+TGF- β 2 quando comparado com o controle ($p < 0,05$). As células transduzidas com *SNAIL* exibiram aumento significativo de *CD90* (6,2x) comparado com as células tratadas com TGF- β 2 ($p < 0,05$). A expressão de *CDH2* foi significativamente elevada (3,3x) nas células *Empty* comparada aos níveis desse gene nas células transduzidas com *SNAIL* ($p < 0,05$).

As PAECs apresentaram um aumento significativo do marcador *SM22* (19,5x) e *CNN1* (275,8x) nas células *SNAIL*+TGF- β 2 comparado ao controle ($p < 0,05$). Além disso, *CNN1* também estava elevado (275,8x) em *SNAIL*+TGF- β 2 comparado com *Empty* ($p < 0,05$). Foi observado uma expressão elevada dos marcadores *FSP1* (23,8x) nas células tratadas com TGF- β 2 comparado com *Empty* e do *CDH2* (4,4x) nas células *Empty* comparado com *SNAIL* ($p < 0,05$) (Figura 9).

As CAECs *SNAIL*+TGF- β 2 apresentaram um aumento significativo (3,2x) na expressão de *FNI* comparadas às células tratadas com TGF- β 2 ($p < 0,05$) (Figura 10). A expressão de *SM22*, *CNN1* e *CD90* foi significativamente elevada (8,3x, 59,6x, 10,6x, respectivamente) nas células *SNAIL*+TGF- β 2 comparado com células *Empty* ($p < 0,05$) (Figura 10).

Em nenhuma das células endoteliais observou-se diminuição significativa da expressão de *CD31* e *CDH5* nos grupos que foram induzidos à EndMT. Conforme esperado, todas as células endoteliais transduzidas com *SNAIL* apresentaram altos níveis de expressão de mRNA dessa molécula, confirmando a superexpressão.

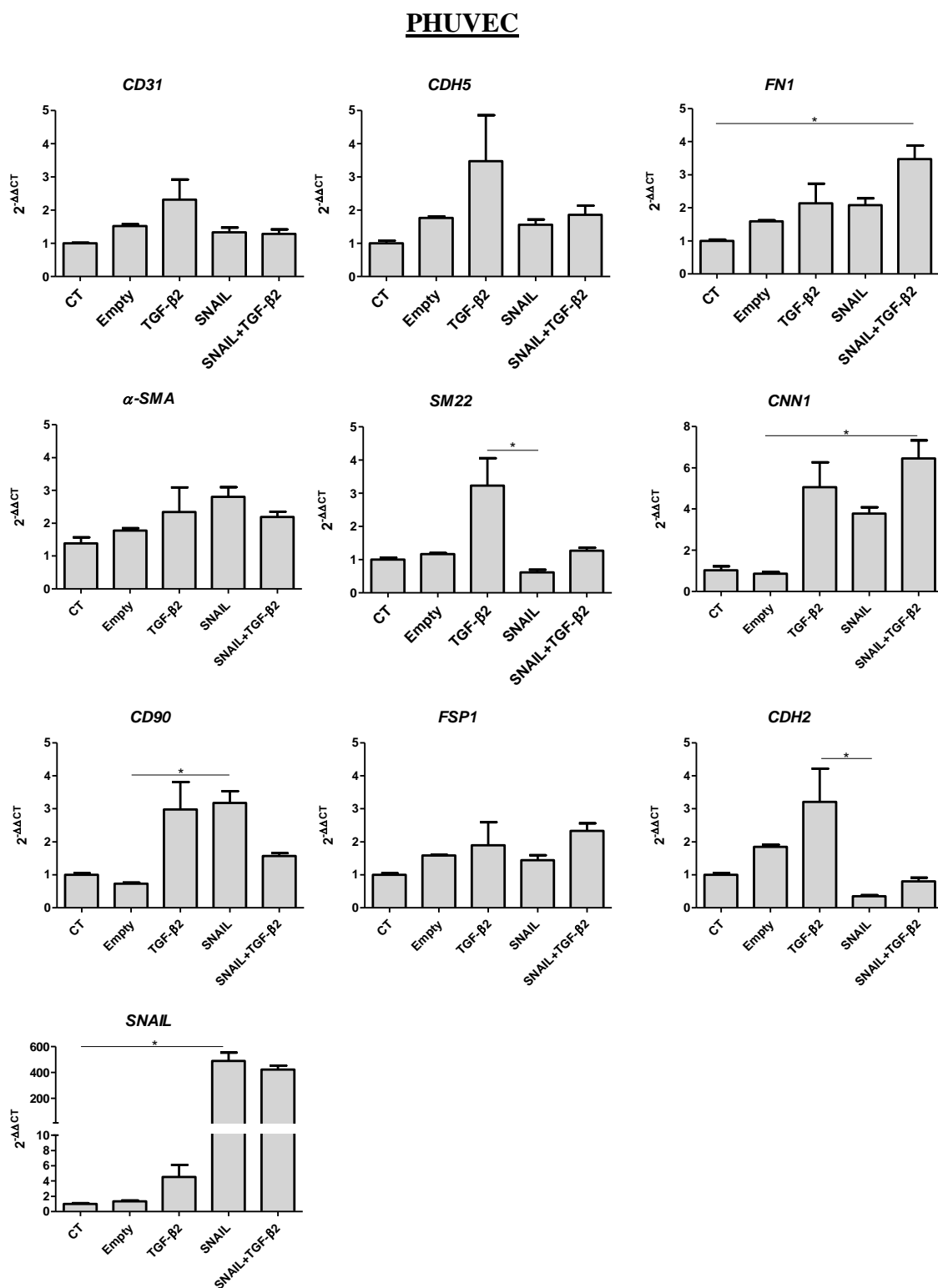


Figura 7. Quantificação relativa da expressão dos genes *CD31*, *CDH5*, *FN1*, *α-SMA*, *SM22*, *CNN1*, *CD90*, *FSP1*, *CDH2* e *SNAIL* nas PHUVECs induzidas à EndMT, utilizando PCR em tempo real. A expressão relativa foi determinada nas amostras PHUVECs controles (CT), nas tratadas com TGF-β2, transduzidas com o vetor vazio (*Empty*), transduzidas com *SNAIL* e transduzidas com *SNAIL* e tratadas com TGF-β2 (*SNAIL*+TGF-β2). As barras representam os valores da expressão relativa obtida a partir do método 2^{-ΔΔCT}. CT: controle. *p<0,05.

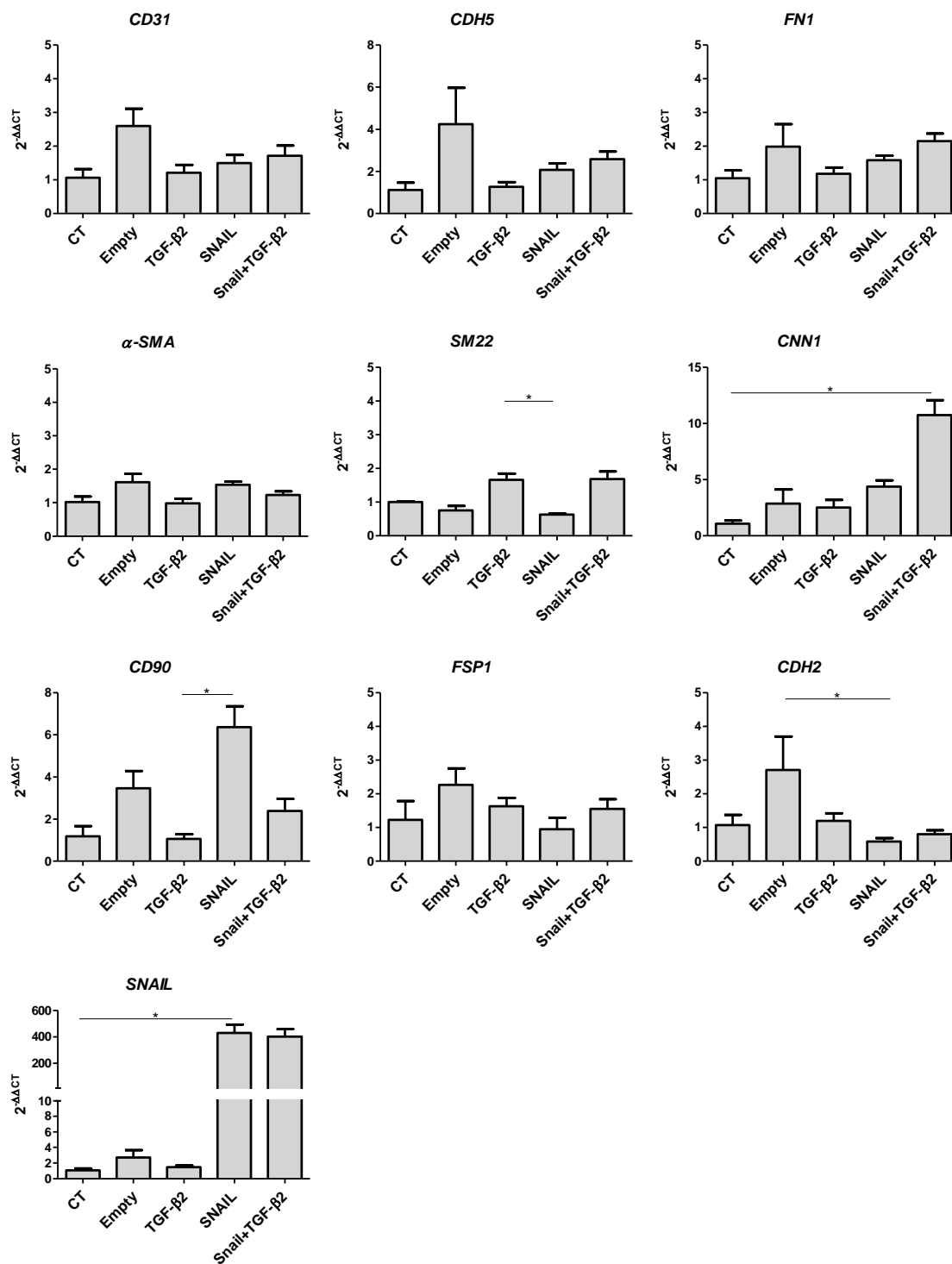
HPAEC

Figura 8. Quantificação relativa da expressão dos genes *CD31*, *CDH5*, *FN1*, α -*SMA*, *SM22*, *CNN1*, *CD90*, *FSP1*, *CDH2* e *SNAIL* nas HPAECs induzidas à EndMT, utilizando PCR em tempo real. A expressão relativa foi determinada nas amostras HPAECs controles (CT), nas tratadas com TGF-β2, transduzidas com o vetor vazio (*Empty*), transduzidas com *SNAIL* e transduzidas com *SNAIL* e tratadas com TGF-β2 (*SNAIL*+TGF-β2). As barras representam os valores da expressão relativa obtida a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. CT: controle. * $p < 0,05$.

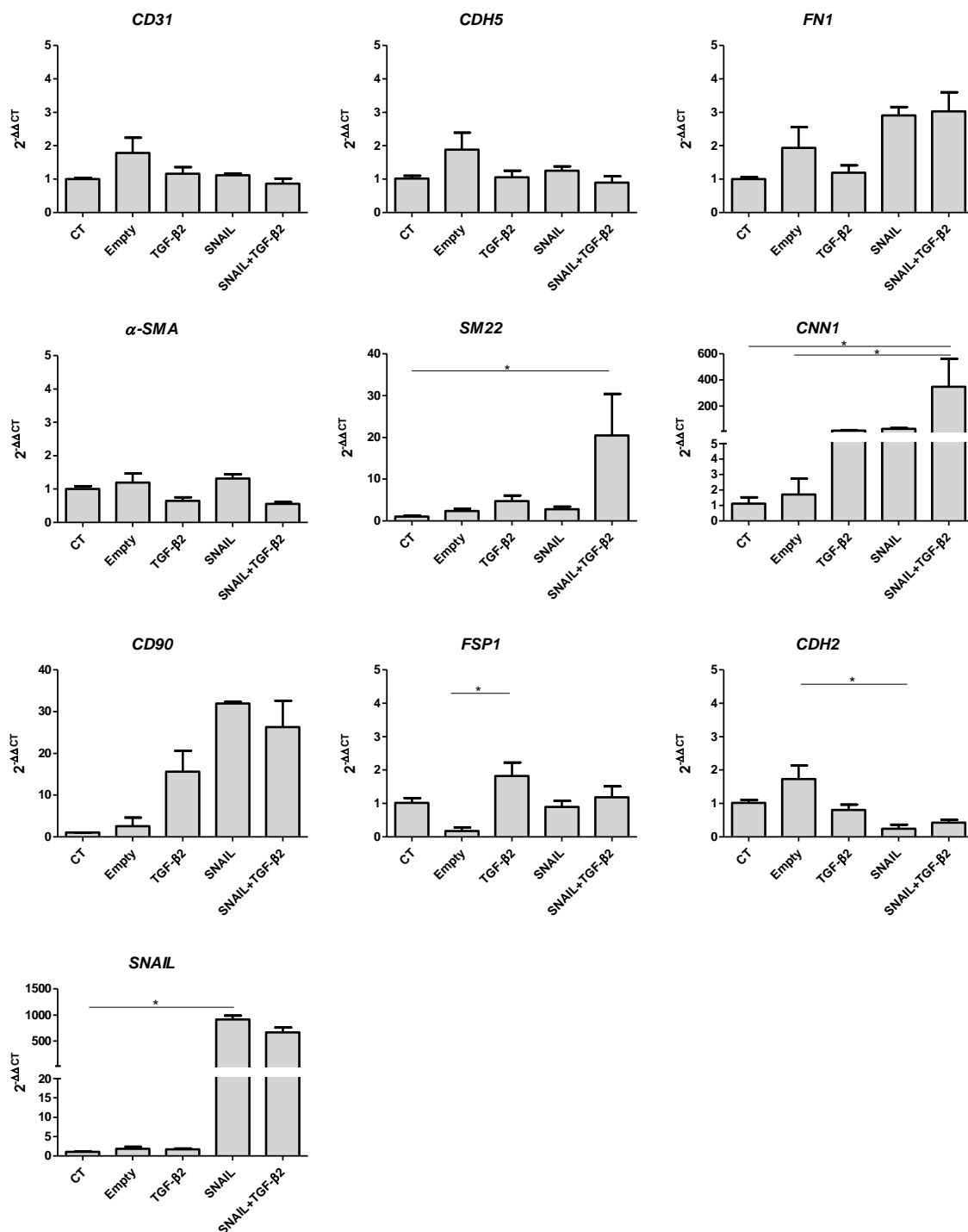
PAEC

Figura 9. Quantificação relativa da expressão dos genes *CD31*, *CDH5*, *FN1*, *α -SMA*, *SM22*, *CNN1*, *CD90*, *FSP1*, *CDH2* e *SNAIL* nas PAECs induzidas à EndMT, utilizando PCR em tempo real. A expressão relativa foi determinada nas amostras PAECs controles (CT), nas tratadas com TGF- β 2, transduzidas com o vetor vazio (*Empty*), transduzidas com *SNAIL* e transduzidas com *SNAIL* e tratadas com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2). As barras representam os valores da expressão relativa obtida a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. CT: controle. * $p < 0,05$.

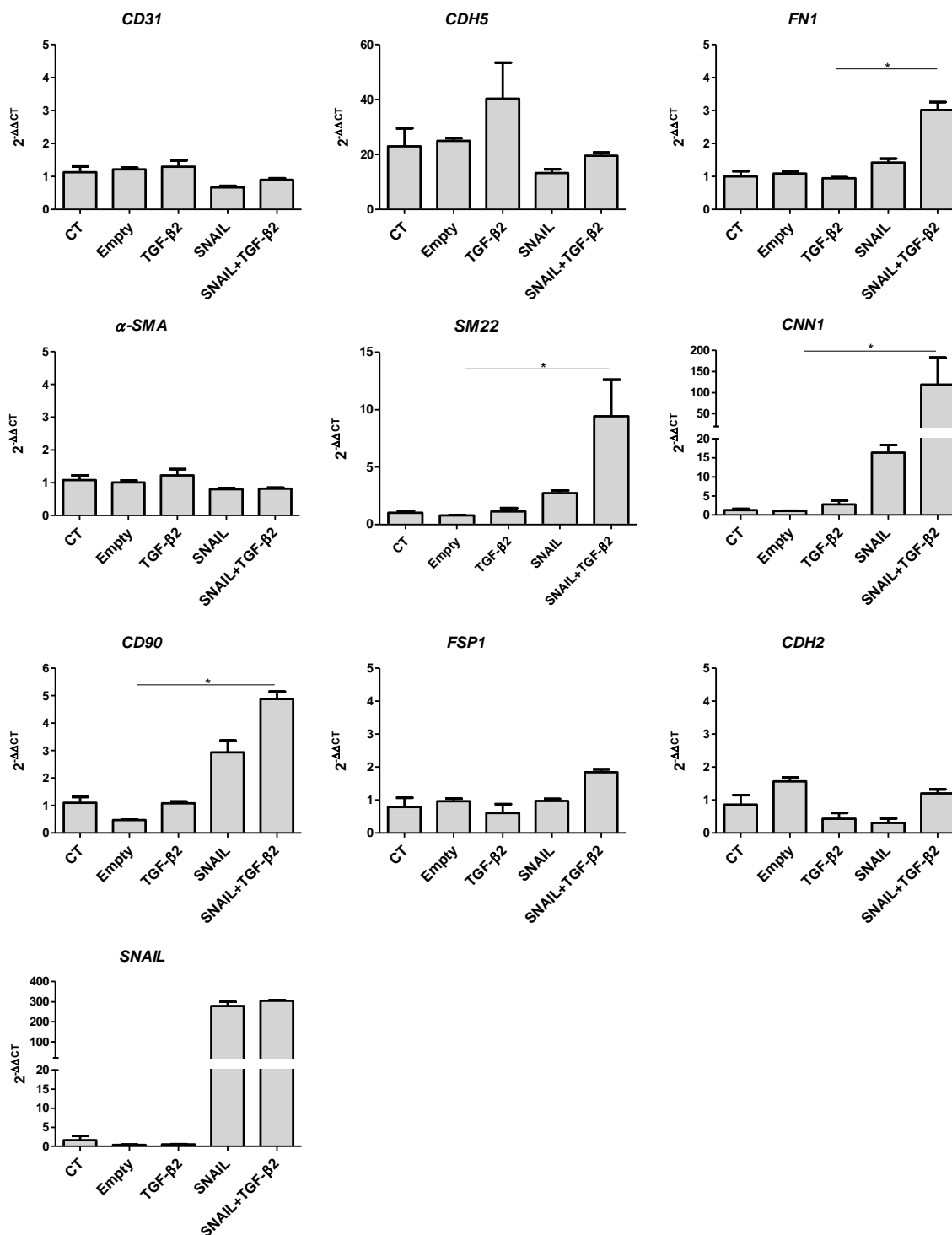
CAEC

Figura 10. Quantificação relativa da expressão dos genes *CD31*, *CDH5*, *FN1*, *α -SMA*, *SM22*, *CNN1*, *CD90*, *FSP1*, *CDH2* e *SNAIL* nas CAECs induzidas à EndMT, utilizando PCR em tempo real. A expressão relativa foi determinada nas amostras CAECs controles (CT), nas tratadas com TGF- β 2, transduzidas com o vetor vazio (*Empty*), transduzidas com *SNAIL* e transduzidas com *SNAIL* e tratadas com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2). As barras representam os valores da expressão relativa obtida a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. CT: controle. * $p < 0,05$.

2.3 Análise geral da expressão gênica das células endoteliais induzidas à EndMT

Os resultados obtidos na qPCR foram utilizados para realizar um *heat map* para melhor observar o perfil de expressão gênica de cada célula endotelial (PHUVEC, PAEC, CAEC e HPAEC) após a indução da EndMT. Conforme observado na Figura 11, as CAECs transduzidas com *SNAIL*, bem como as células *SNAIL*+TGF- β 2 apresentaram uma maior expressão dos marcadores mesenquimais. Dessa forma, dentre as quatro análises realizadas, as CAECs foram as células que apresentaram maior mudança no perfil de expressão após a indução da EndMT.

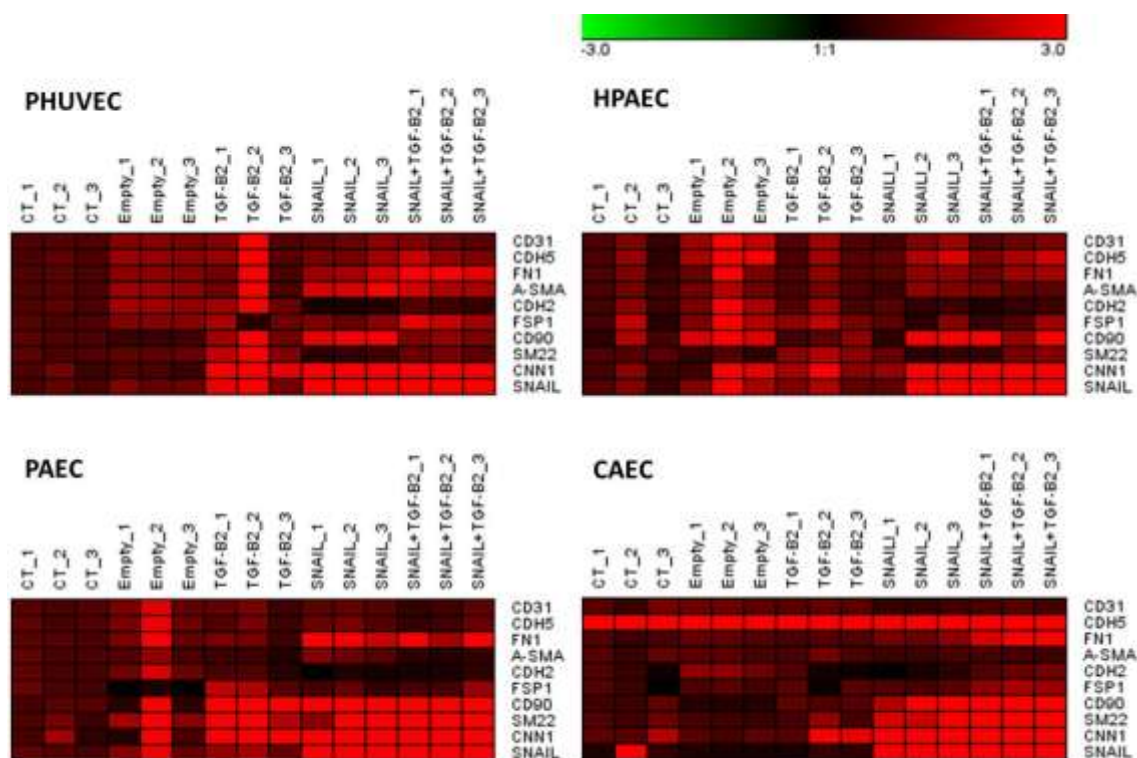


Figura 11. Perfil de expressão dos genes relacionados com EndMT nas células PHUVEC, HPAEC, PAEC e CAEC após a indução. As células endoteliais foram induzidas por meio do tratamento com TGF- β 2 e pela transdução de *SNAIL* associado ou não ao tratamento com TGF- β 2. Foi realizada a transdução de um vetor vazio (*Empty*) como controle do experimento. As colunas representam as condições de indução da EndMT e as linhas representam os genes avaliados. A coloração do *cluster* é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave no topo da figura. CT: controle.

2.4 Análise da expressão proteica das CAECs induzidas à EndMT

Para confirmar as alterações fenotípicas das CAECs, foi realizada a análise proteica dos marcadores CD31, CDH5, SM22 e SNAIL (Figura 12). Foi observado uma discreta diminuição na expressão de CD31 nas CAECs induzidas com *SNAIL*+TGF- β 2, bem como de CDH5. A expressão diminuída de CDH5 também foi observada nas células transduzidas com *SNAIL*. A expressão de SM22 foi elevada nas células *SNAIL*+TGF- β 2. Ademais, as células endoteliais transduzidas com *SNAIL* apresentaram altos níveis de expressão desta proteína, confirmando a superexpressão. A proteína GAPDH foi utilizada como controle endógeno das amostras analisadas.

Portanto, devido ao fato da EndMT ser mais proeminente nas CAECs, as mesmas foram selecionadas para a análise do perfil de expressão gênica em larga escala por meio da técnica de *microarray*.

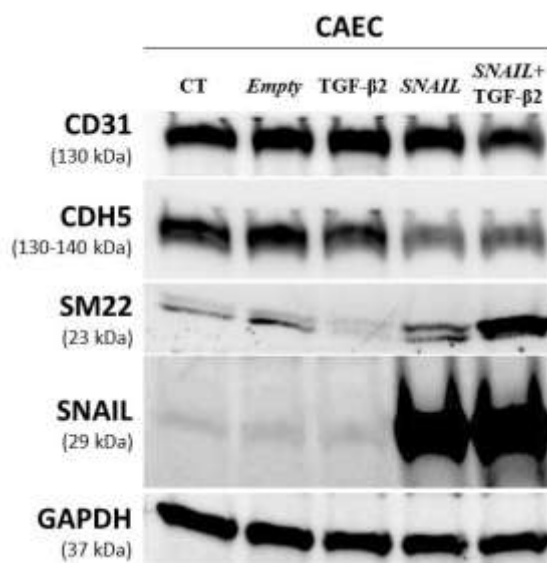


Figura 12. Expressão das proteínas CD31, CDH5, SM22, SNAIL e GAPDH por *Western blot*. A análise da expressão das proteínas foi realizada nas amostras CAEC controle (CT), transduzidas com o vetor vazio (*Empty*), tratadas com TGF- β 2, transduzidas com *SNAIL*, transduzidas com *SNAIL* e associadas ao tratamento com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2).

3. Análise de expressão gênica global pelo método de *microarray*

3.1 Processamento dos dados

Um total de 14 bibliotecas de *microarray* foi utilizado para as análises de expressão gênica, compreendendo três amostras CAECs controle (CT); três CAECs tratadas com TGF- β 2; duas amostras CAECs transduzidas com o vetor vazio (*Empty*); três CAECs transduzidas com o vetor *SNAIL*; e três CAECs transduzidas com o vetor *SNAIL* e associadas ao tratamento com TGF- β 2.

A análise de cada biblioteca revelou 60.000 sondas presentes na lâmina. Em seguida, os dados brutos de todas as bibliotecas tiveram o sinal extraído e processado, resultando no total de 22.159 sondas. Posteriormente, os genes que possuíam *log10 fold change* > 2 e *p* valor ajustado < 0,005 foram selecionados.

3.2 Semelhanças nos níveis de expressão

Após os dados serem processados, foi realizado um agrupamento hierárquico com o objetivo de avaliar as semelhanças nos níveis de expressão de cada amostra. A análise resultou em um dendrograma contendo dois principais grupos. O primeiro grupo contém as CAECs transduzidas com *SNAIL*, bem como as CAECs transduzidas com *SNAIL* e associadas ao tratamento com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2). O segundo grupo contém as CAEC controle, transduzidas com o vetor vazio (*Empty*) e tratadas com TGF- β 2 (Figura 13). É possível observar que as células transduzidas com *SNAIL* (*SNAIL*; *SNAIL*+TGF- β 2) sofreram alteração no transcrito das células CAECs de origem de modo expressivo.

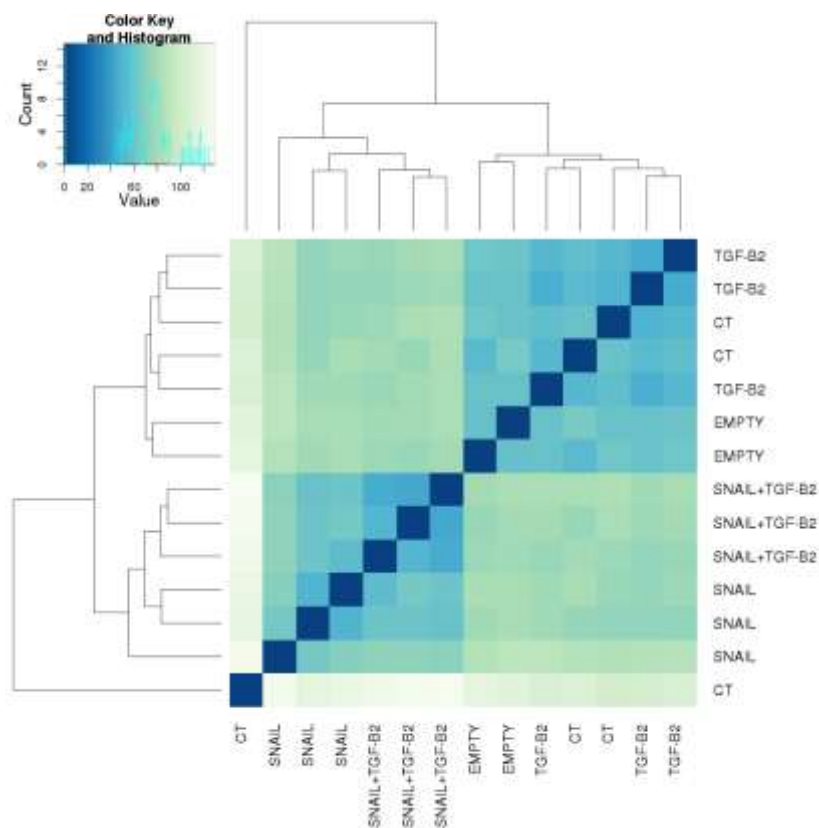


Figura 13. Dendrograma mostrando o agrupamento hierárquico das CAECs induzidas à EndMT. A análise do transcriptoma foi realizada nas amostras CAEC controle (CT), transduzidas com o vetor vazio (*Empty*), tratadas com TGF- β 2, transduzidas com *SNAIL*, transduzidas com *SNAIL* e associadas ao tratamento com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2). O agrupamento hierárquico foi obtido utilizando o parâmetro distância euclidiana. As amostras foram agrupadas de acordo com suas similaridades.

3.3 Análises dos genes diferencialmente expressos

Os diferentes grupos (Controle, *Empty*, TGF- β 2, *SNAIL*, *SNAIL*+TGF- β 2) foram comparados entre si e os genes que possuíam \log_{10} fold change > 2 e p valor ajustado <0,005 foram selecionados. Ao comparar o grupo CT com o grupo *Empty* foi observado apenas um gene diferencialmente expresso (RDH16). Esses dados estão de acordo com o esperado, uma vez que as células transduzidas com o vetor vazio (*Empty*) não devem suscitar alterações moleculares e devem, portanto, apresentar similaridade com o grupo controle. Dessa forma, as análises comparativas entre os diferentes grupos foram realizadas considerando somente o grupo controle.

As análises que compararam o grupo CT com o grupo *SNAIL* revelaram 541 genes diferencialmente expressos, sendo que 352 genes estavam mais expressos e 189 genes estavam menos expressos no grupo *SNAIL* (Figura 14A). A comparação entre o grupo CT e *SNAIL*+TGF-

β 2 mostraram 659 genes diferencialmente expressos, dentre eles 379 genes estavam mais expressos e 280 estavam menos expressos no grupo *SNAIL*+TGF- β 2 (Figura 14B). Não foi observado nenhum gene diferencialmente expresso entre CT e TGF- β 2.

Ainda, foi comparado o grupo *SNAIL* com o grupo TGF- β 2, revelando um total de 541 genes diferencialmente expressos, 217 mais expressos e 324 menos expressos no grupo TGF- β 2 (Figura 14C). A comparação entre o grupo *SNAIL*+TGF- β 2 e TGF- β 2 apresentaram 576 genes diferencialmente expressos, no quais 264 estavam mais expressos e 312 menos expressos no grupo TGF- β 2 (Figura 14D). Por fim, nas análises entre *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2 foram observados 20 genes diferencialmente expressos, sendo apenas oito genes mais expressos e 12 menos expressos no grupo *SNAIL*+TGF- β 2 (Figura 14E). As listas dos 100 genes mais diferencialmente expressos de todas as análises realizadas estão descritas nos Apêndices.

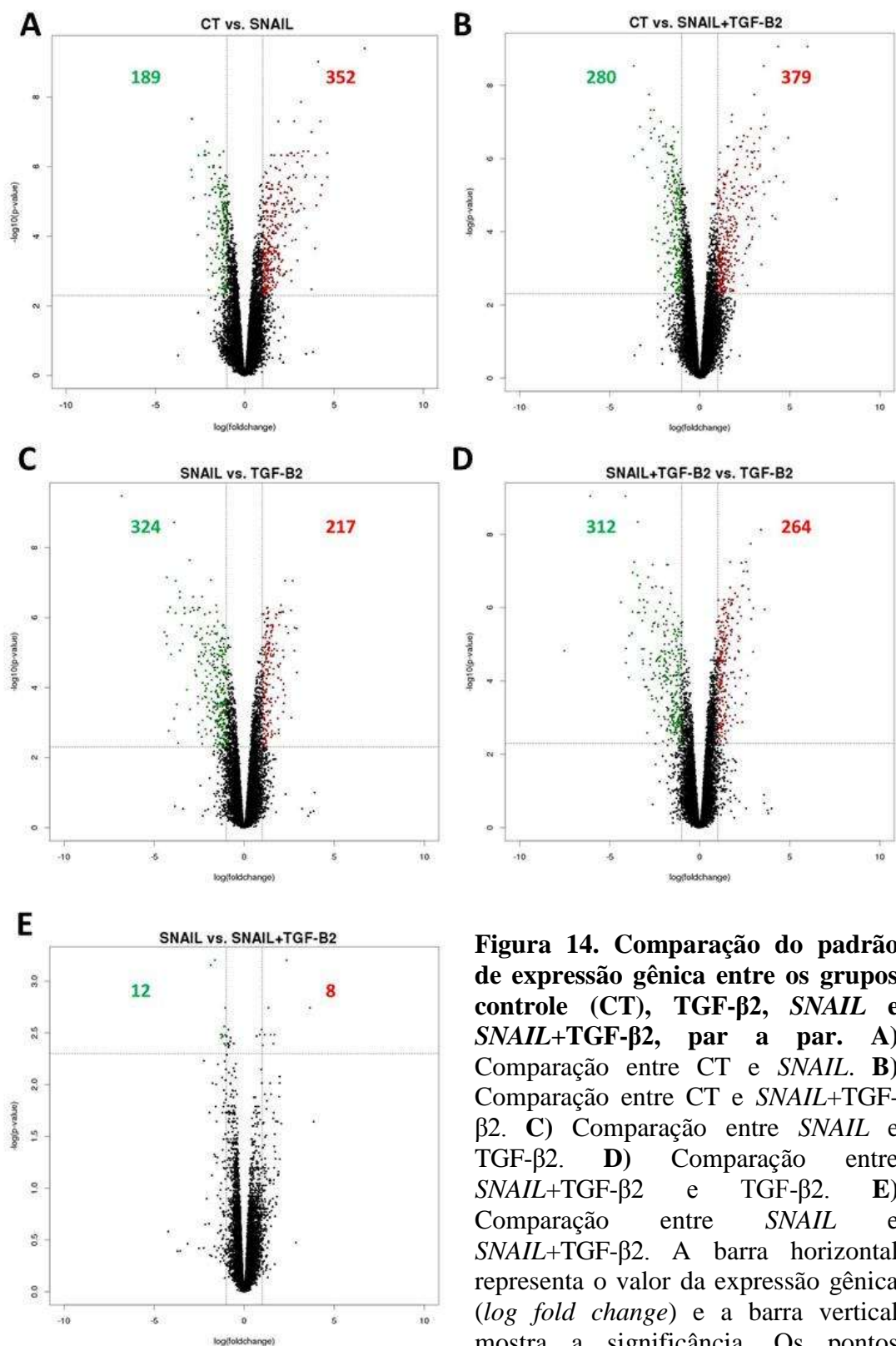


Figura 14. Comparação do padrão de expressão gênica entre os grupos controle (CT), TGF-β2, SNAIL e SNAIL+TGF-β2, par a par. A) Comparação entre CT e SNAIL. **B)** Comparação entre CT e SNAIL+TGF-β2. **C)** Comparação entre SNAIL e TGF-β2. **D)** Comparação entre SNAIL+TGF-β2 e TGF-β2. **E)** Comparação entre SNAIL e SNAIL+TGF-β2. A barra horizontal representa o valor da expressão gênica (*log fold change*) e a barra vertical mostra a significância. Os pontos verdes significam os genes menos expressos e os vermelhos os genes mais expressos.

3.4 Caracterização dos perfis de expressão gênica das CAECs submetidas à EndMT

Com o objetivo de melhor caracterizar as diferenças entre os perfis de expressão gênica de cada condição submetida à indução da EndMT, foi realizada um *heat map* com os 50 genes mais diferencialmente expressos (Figura 15). É possível notar que as análises entre CT vs. *SNAIL*, CT vs. *SNAIL*+TGF- β 2, *SNAIL* vs. TGF- β 2, *SNAIL*+TGF- β 2 vs. TGF- β 2 resultaram em um dendrograma contendo dois principais grupos: i) CAECs transduzidas com *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2; ii) CAECs controle, *Empty* e TGF- β 2. Entretanto, na análise entre *SNAIL* vs. *SNAIL*+TGF- β 2 foram observados três grupos: i) CAECs *SNAIL*; ii) CAECs *SNAIL*+TGF- β 2; iii) CAECs controle, *Empty* e TGF- β 2. É possível notar que o grupo *SNAIL* tem maior similaridade com o grupo *SNAIL*+TGF- β 2 do que com os demais grupos avaliados. Portanto, tanto a expressão de *SNAIL* sozinho quanto associado ao tratamento com TGF- β 2 resultou em um perfil de expressão gênica diferente do original, sugerindo que a indução da EndMT foi mais proeminente nesses dois grupos.

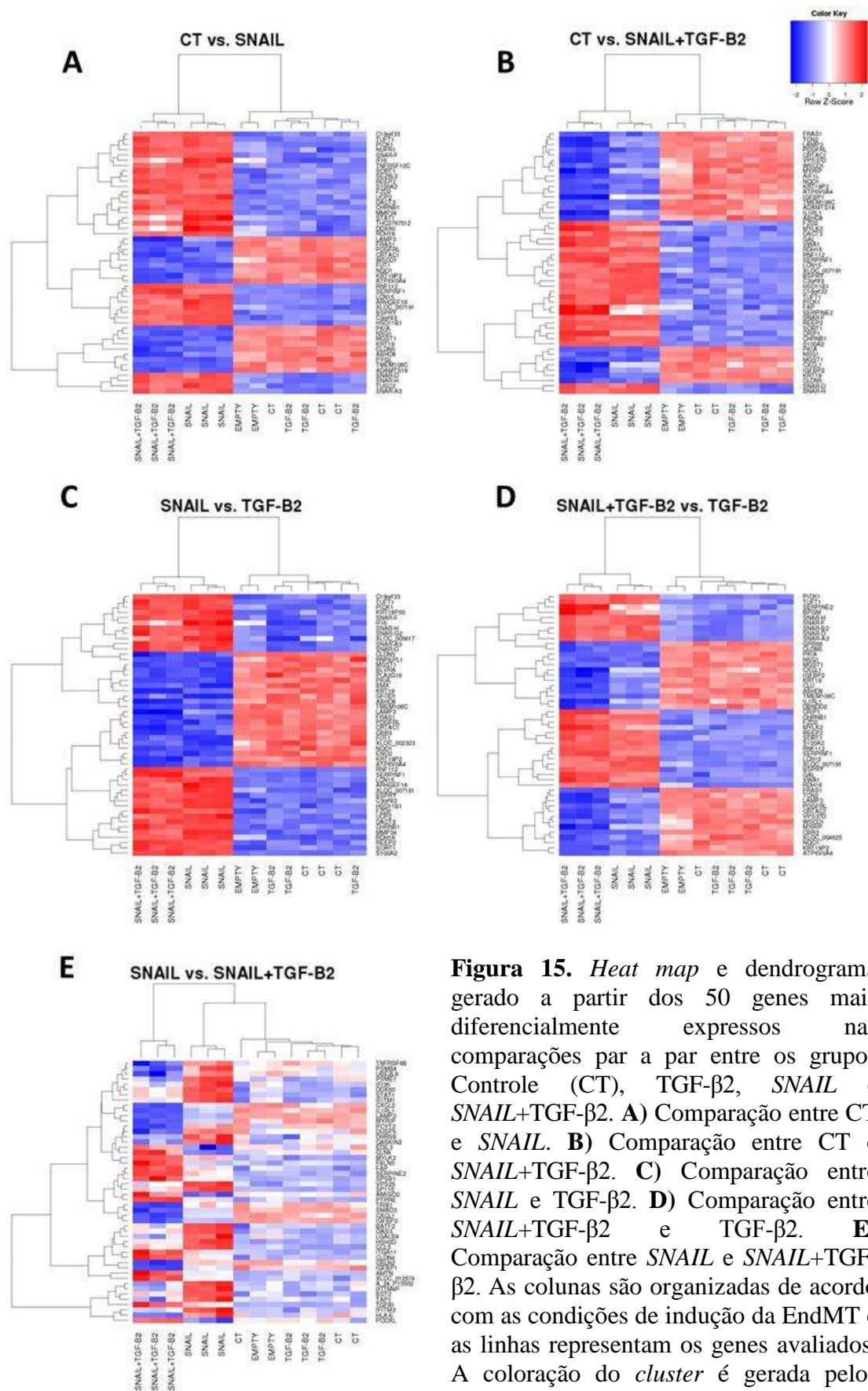


Figura 15. Heat map e dendrograma gerado a partir dos 50 genes mais diferencialmente expressos nas comparações par a par entre os grupos Controle (CT), TGF- β 2, *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2. **A)** Comparação entre CT e *SNAIL*. **B)** Comparação entre CT e *SNAIL*+TGF- β 2. **C)** Comparação entre *SNAIL* e TGF- β 2. **D)** Comparação entre *SNAIL*+TGF- β 2 e TGF- β 2. **E)** Comparação entre *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2. As colunas são organizadas de acordo com as condições de indução da EndMT e as linhas representam os genes avaliados. A coloração do cluster é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave no topo da figura.

3.5 Obtenção de redes gênicas

Neste estudo, foram utilizadas ferramentas de bioinformática com a finalidade de analisar a associação de diferentes genes na determinação de uma única característica, no qual resulta na formação de redes gênicas. Dessa forma, com o objetivo de avaliar as interações entre os genes diferencialmente expressos, foram realizadas as análises entre os grupos CT vs. *SNAIL* e CT vs. *SNAIL*+TGF- β 2 para obtenção das redes. As mesmas foram obtidas por meio do software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA).

Conforme observado na Figura 16, a rede formada demonstra que houve a interação entre diversos genes diferencialmente expressos entre os grupos CT vs. *SNAIL*. Dentre esses genes foi observado uma superexpressão dos marcadores mesenquimais *COL1A1*, *COL1A2* e *CNN1* e dos fatores de crescimento TGF- β 1 e TGF- β 2, bem como uma diminuição do marcador epitelial citoqueratina 19 (*KRT19*) no grupo *SNAIL*. Os genes que compõe essa rede estão envolvidos principalmente com a organização, manutenção e função celular, desenvolvimento do sistema cardiovascular e com o câncer. Ainda, foram listados os 10 genes mais e menos diferencialmente expressos entre os grupos CT e *SNAIL* e observou-se que *COL1A1* e *KRT19* estavam presentes nessa lista.

Semelhantes resultados foram obtidos nas análises entre os grupos CT vs. *SNAIL*+TGF- β 2 (Figura 17). Foi observado uma superexpressão dos marcadores mesenquimais *COL1A1*, *COL1A2*, *CNN1* e *FNI*, dos fatores de crescimento TGF- β 1 e TGF- β 2 e dos marcadores das vias de sinalização *NOTCH3* e *WNT*, bem como uma diminuição do marcador epitelial *KRT19* no grupo *SNAIL*+TGF- β 2. Os genes que compõe essa rede estão envolvidos principalmente com o desenvolvimento, crescimento, proliferação e manutenção celular, movimento celular, desenvolvimento embrionário e desenvolvimento do sistema hematológico. Ademais, na lista dos 10 genes mais e menos diferencialmente expressos entre CT e *SNAIL*+TGF- β 2 observou-se a presença dos genes *COL1A1*, *COL1A2*, *CNN1* e *KRT19* (Figura 17).

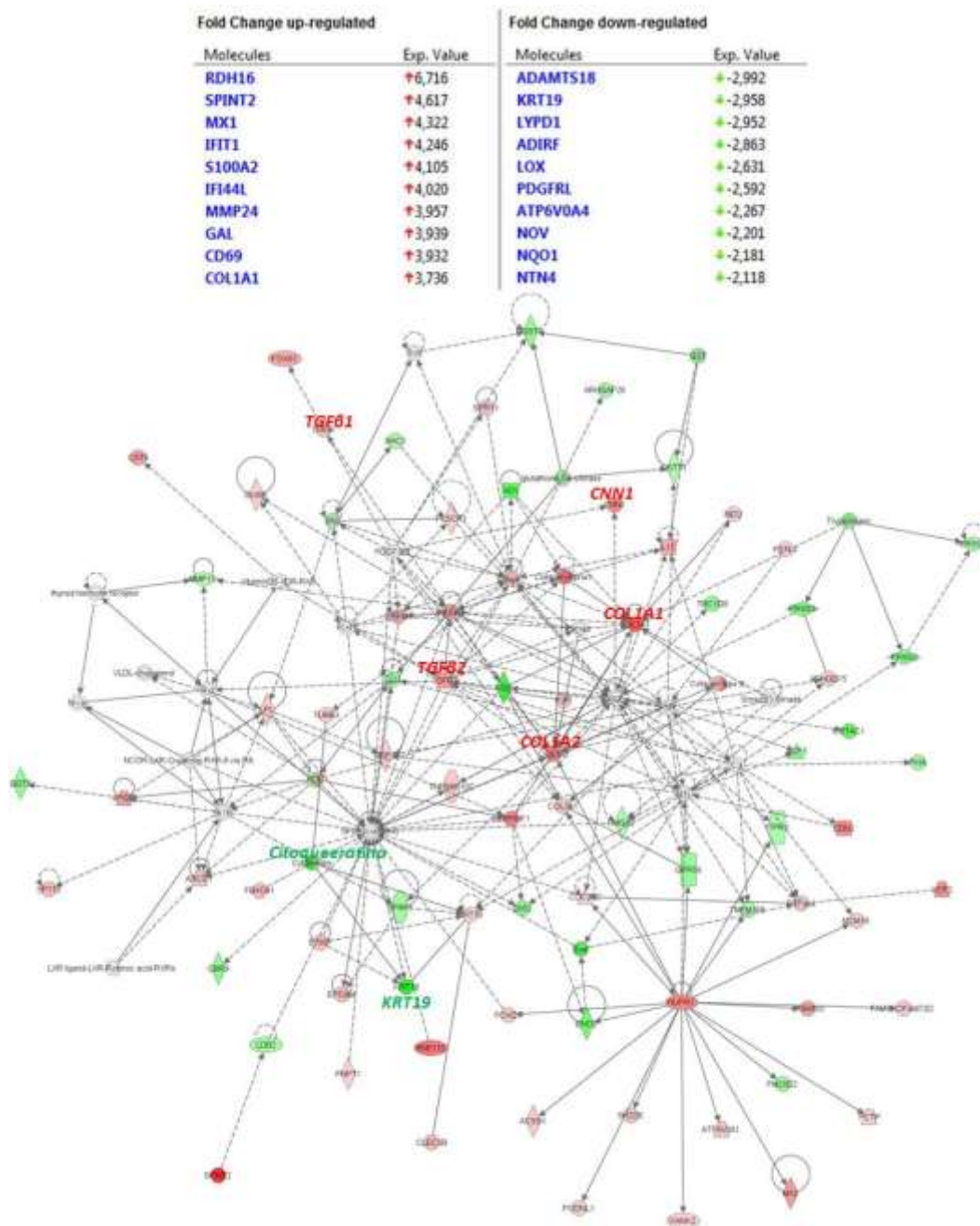


Figura 16. Análise de interação dos genes com expressão diferenciada entre as comparações CT vs. *SNAIL* pelo software *Ingenuity Pathway Analysis*. As cores vermelha e verde representam, respectivamente, os genes mais e menos expressos nas células CAECs controle (CT) em comparação com as células transduzidas com o fator de transcrição *SNAIL*. A intensidade das cores é proporcional à razão de expressão (*log fold change*) entre os sinais obtidos nos *microarrays*. Os 10 genes mais induzidos e reprimidos no grupo *SNAIL* foram listados, bem como os seus valores de *log fold change*.

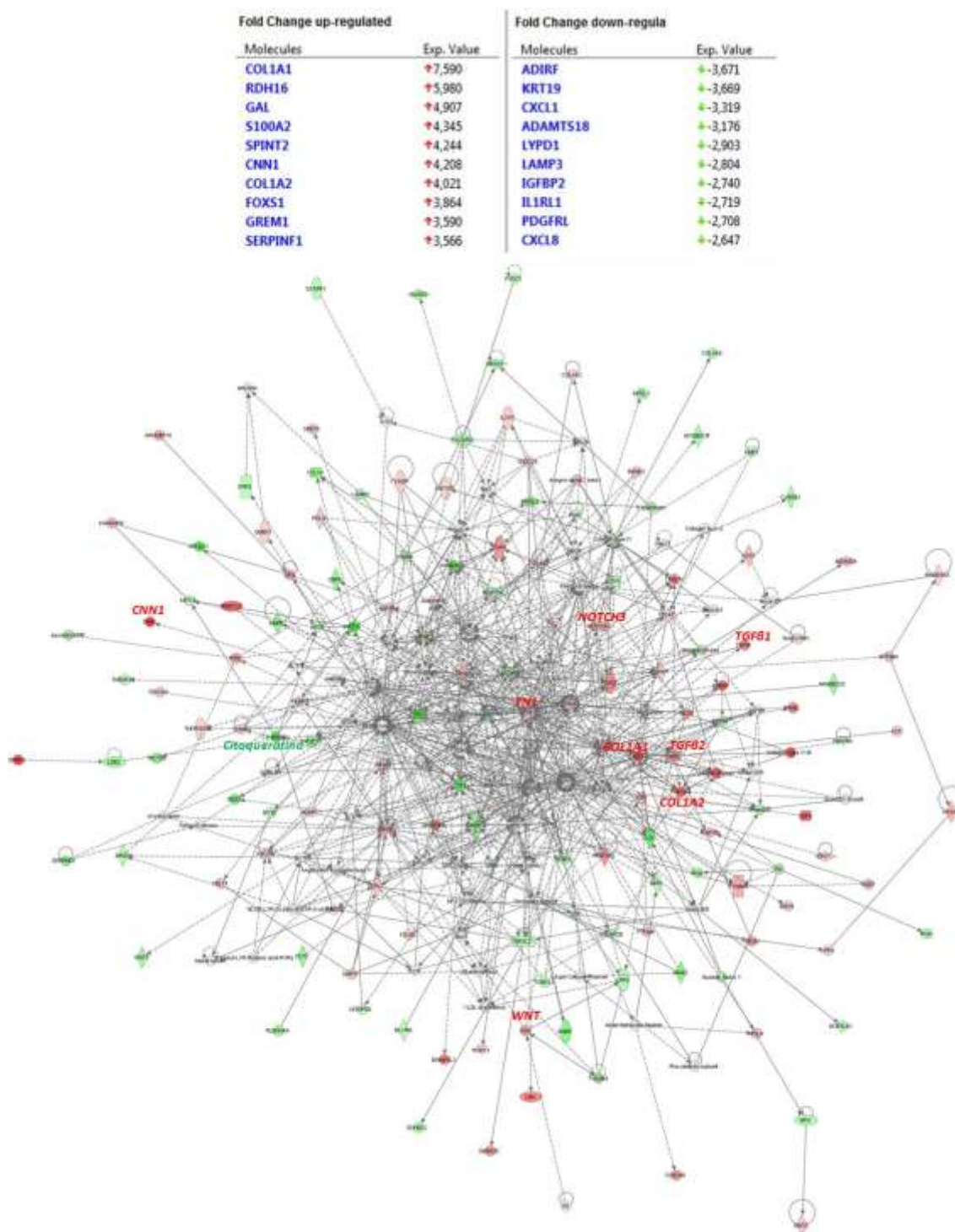


Figura 17. Análise de interação dos genes com expressão diferenciada entre as comparações CT vs. *SNAIL*+TGF- β 2 pelo software *Ingenuity Pathway Analysis*. As cores vermelha e verde representam, respectivamente, os genes mais e menos expressos nas células CAECs controle (CT) em comparação com as células transduzidas com o fator de transcrição *SNAIL* e associadas ao tratamento com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2). A intensidade das cores é proporcional à razão de expressão (*log fold change*) entre os sinais obtidos nos *microarrays*. Os 10 genes mais induzidos e reprimidos no grupo *SNAIL*+TGF- β 2 foram listados, bem como os seus valores de *log fold change*.

3.6 Validação dos genes diferencialmente expressos

Para validar os resultados obtidos pelo *microarray*, a expressão dos genes *COL1A1*, *COL1A2* e *KRT19* foram quantificadas por qPCR. O aumento da expressão do *COL1A1* e *COL1A2* e a diminuição do *KRT19* foi comprovada no grupo *SNAIL*+TGF- β 2 ($p < 0,05$) (Figura 18A). Devido à alta expressão do *COL1A1*, a proteína codificada por este gene foi avaliada por meio de *Western blot*. Conforme esperado, a expressão de *COL1A1* estava elevada no grupo *SNAIL*+TGF- β 2 (Figura 18B).

É importante ressaltar que embora os resultados sejam semelhantes nas comparações entre o grupo controle com os grupos *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2 nos dados obtidos nos *microarrays*, o grupo *SNAIL*+TGF- β 2 apresentou uma maior expressão dos marcadores mesenquimais, sugerindo que a associação entre *SNAIL* e TGF- β 2 potencializa a indução da EndMT.

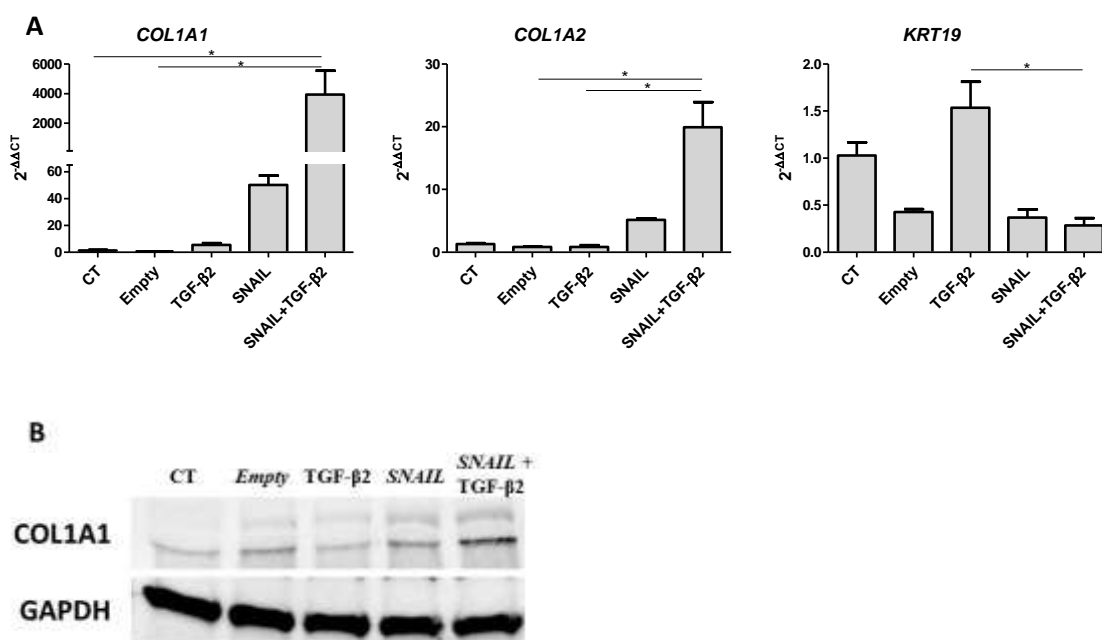


Figura 18. Validação dos genes diferencialmente expressos no *microarray* pelas metodologias de PCR em tempo real e *Western blot*. A) A expressão relativa dos genes *COL1A1*, *COL1A2* e *KRT19* foi determinada nas amostras CAECs controles (CT), nas tratadas com TGF- β 2, transduzidas com o vetor *Empty*, transduzidas com *SNAIL* e transduzidas com *SNAIL* e tratadas com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2) por PCR em tempo real. As barras representam os valores da expressão relativa obtida a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. * $p < 0,05$. B) A expressão proteica de *COL1A1* e GAPDH foi realizada nas amostras CAECs CT, *Empty*, TGF- β 2, *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2 por *Western blot*.

3.7 Análises das vias de sinalização

Os genes diferencialmente expressos entre as análises CT vs. *SNAIL* e CT vs. *SNAIL*+TGF- β 2 foram analisados quanto a participação em vias canônicas pelo *software Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). Dentre as vias canônicas mais representadas, a via de regulação da transição epitélio-mesenquimal foi presente em ambas as análises. Essa via de sinalização é regulada por quatro principais mecanismos incluindo o fator de crescimento TGF- β 2 e as vias de sinalização Wnt, Notch e Receptor de Tirosina Quinase (Figura 19).

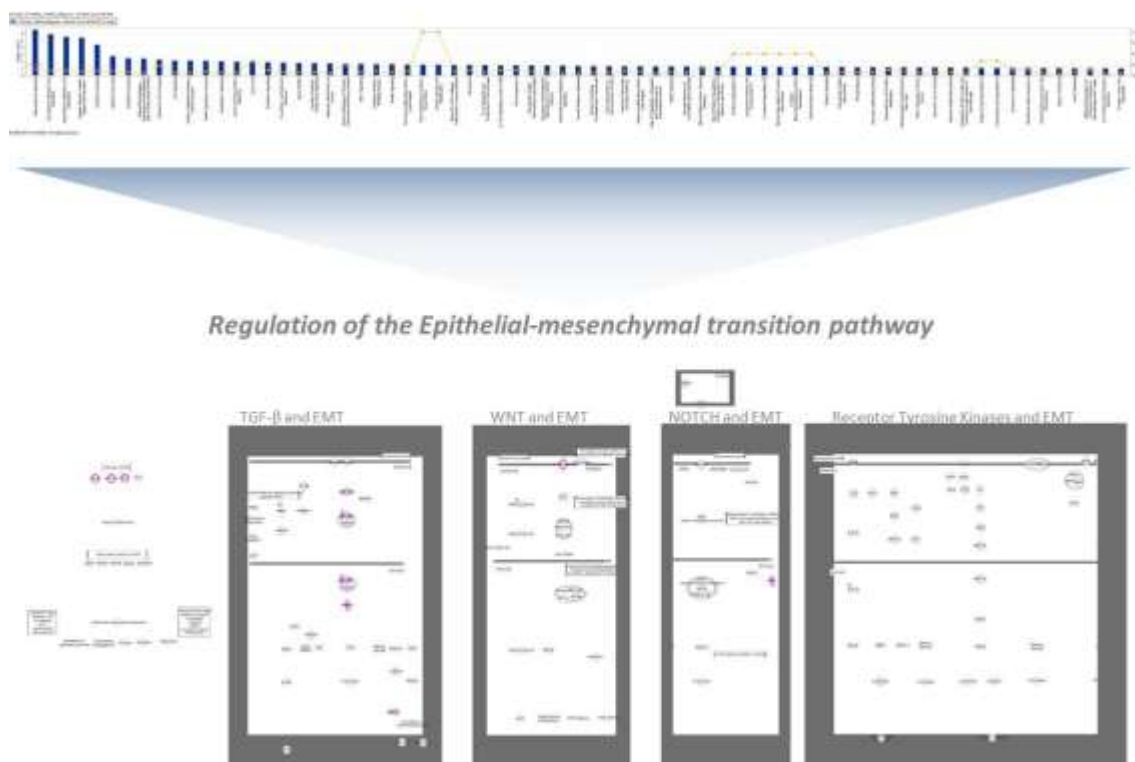


Figura 19. Vias de sinalização canônicas gerada pelo *software Ingenuity Pathway Analysis* quando comparados os genes diferencialmente expressos do grupo controle com os grupos *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2. Dentre as vias canônicas mais representadas, destaca-se a via de regulação da transição epitélio-mesenquimal, que compreende o fator TGF- β 2 e as vias de sinalização Wnt, Notch e Receptor de Tirosina Quinase.

Ademais, foi observada a participação dos genes *NOTCH3* e *WNT5B* na via de regulação da transição epitélio-mesenquimal, bem como a sua expressão aumentada no grupo *SNAIL*+TGF- β 2. Dessa forma, ambos os genes foram validados por qPCR (Figura 20). Conforme esperado, houve um aumento significativo da expressão de *NOTCH3* (8,9x) e *WNT5B* (223x) no grupo *SNAIL*+TGF- β 2 comparado com *Empty* e com TGF- β 2, respectivamente ($p < 0,05$).

Além disso, a expressão de β -*CATENINA* também foi avaliada devido ao fato de *WNT5B* inibir a via canônica WNT dependente de β -catenina (KANAZAWA et al., 2005). Conforme esperado, nenhuma diferença foi observada na expressão de β -*CATENINA* nos diversos grupos avaliados (Figura 20).

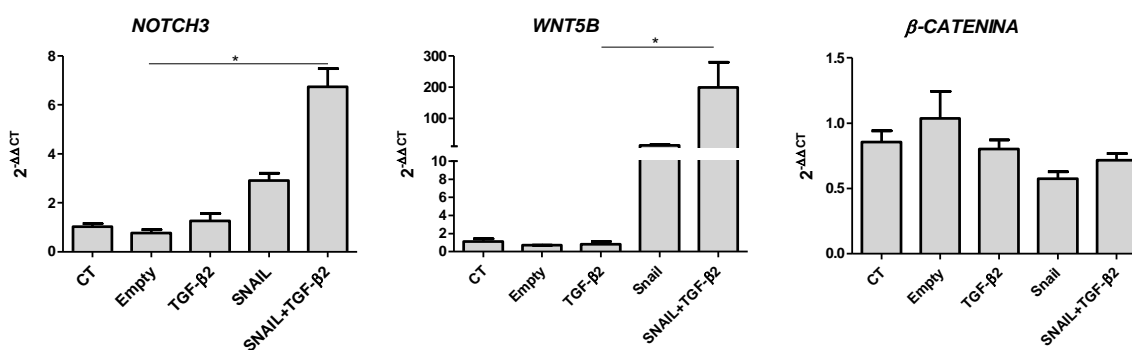


Figura 20. Quantificação relativa da expressão dos genes envolvidos na via Notch (*NOTCH3*) e Wnt (*WNT5B*, β -*CATENINA*), utilizando PCR em tempo real. A expressão relativa foi determinada nas amostras CAECs controles (CT), nas tratadas com TGF- β 2, transduzidas com o vetor vazio (*Empty*), transduzidas com *SNAIL* e transduzidas com *SNAIL* e tratadas com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2). As barras representam os valores da expressão relativa obtida a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. * $p < 0,05$.

4. Avaliação da formação de estruturas semelhantes a capilares em Matrigel®

Para comprovar a capacidade funcional *in vitro* das células endoteliais, as CAECs controle, transduzida com o vetor vazio (*Empty*), tratadas com TGF- β 2, transduzida com o fator de transcrição *SNAIL* e transduzida com o fator de transcrição *SNAIL* e associadas ao tratamento com TGF- β 2 foram avaliadas quanto a capacidade de formação de túbulos capilares.

Esse ensaio comprovou a capacidade que as CEs possuem de formar estruturas complexas semelhantes a redes vasculares (Figura 21), uma vez que essas estruturas foram

observadas nas CAECs controle e transduzidas com o vetor vazio (*Empty*). Entretanto, as CEs induzidas para sofrer EndMT com os fatores TGF- β 2, *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2 não foram capazes de formar as estruturas semelhantes aos capilares.

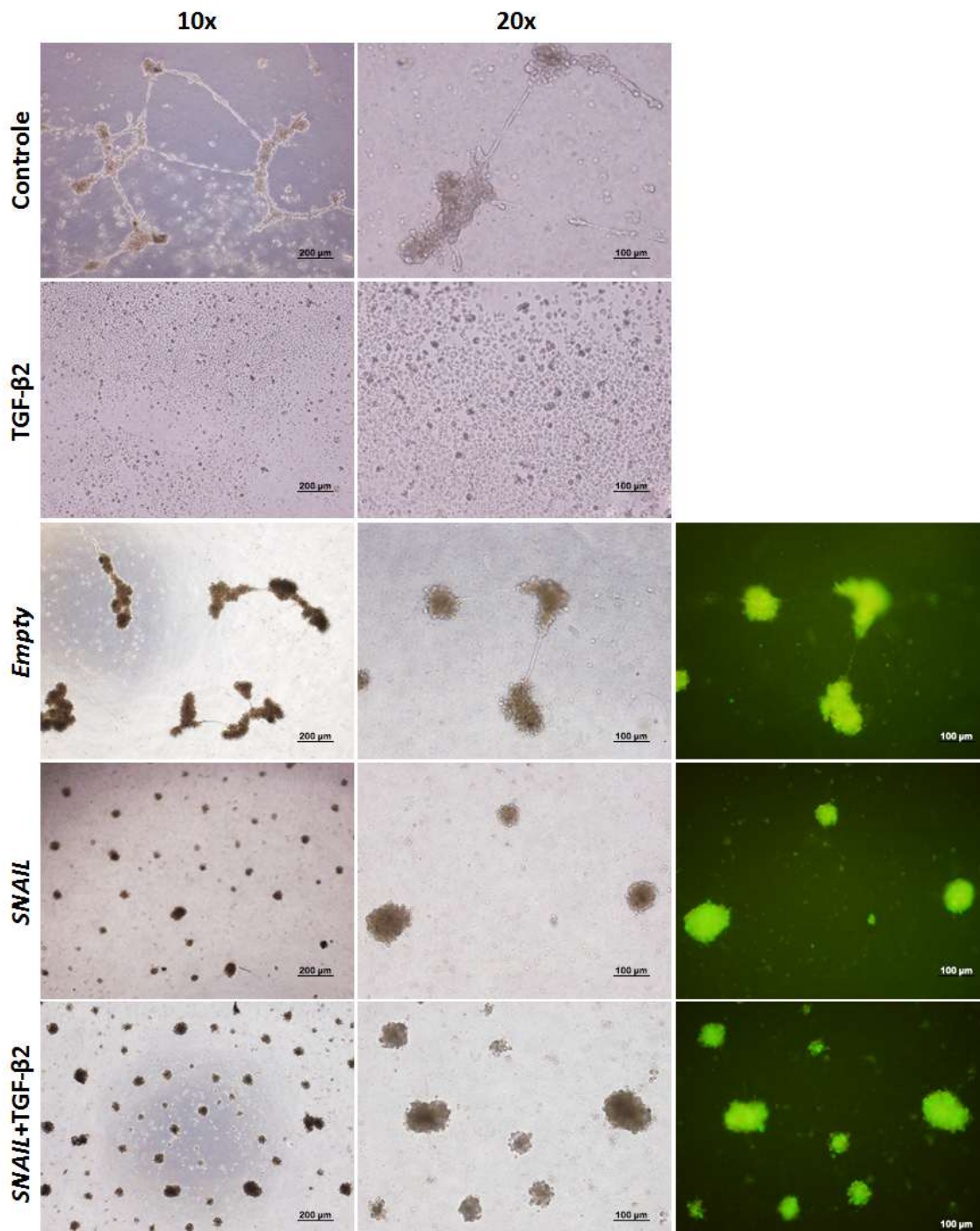


Figura 21. Caracterização das células endoteliais CAECs quanto à formação de estruturas semelhantes a capilares. A formação de estruturas semelhantes a capilares foi determinada nas amostras CAECs controles (CT), nas tratadas com TGF- β 2, transduzidas com o vetor vazio (*Empty*), transduzidas com *SNAIL* e transduzidas com *SNAIL* e tratadas com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2). As imagens foram obtidas em contraste de fase e por epifluorescência das células GFP positivas no aumento de 10x e 20x com 24 horas.

5. Avaliação da migração celular após a indução da EndMT

Levando em consideração que as células mesenquimais apresentam capacidade migratória, as CAECs induzidas a sofrerem EndMT foram avaliadas quanto a motilidade. Desse modo, foi realizado o *scratch assay*, no qual é realizado um traço na monocamada de células, e a migração das células foi observada após 24 horas.

Após o período determinado, as CAECs transduzidas com *SNAIL* e associadas ao tratamento com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2) obtiveram uma migração significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado com *Empty* (2x), TGF- β 2 (1,8x) e *SNAIL* (2,5x) (Figura 22). Além disso, é possível notar que essa migração aconteceu com as células que foram transduzidas com o fator de transcrição *SNAIL*, representadas pela proteína reporter GFP.

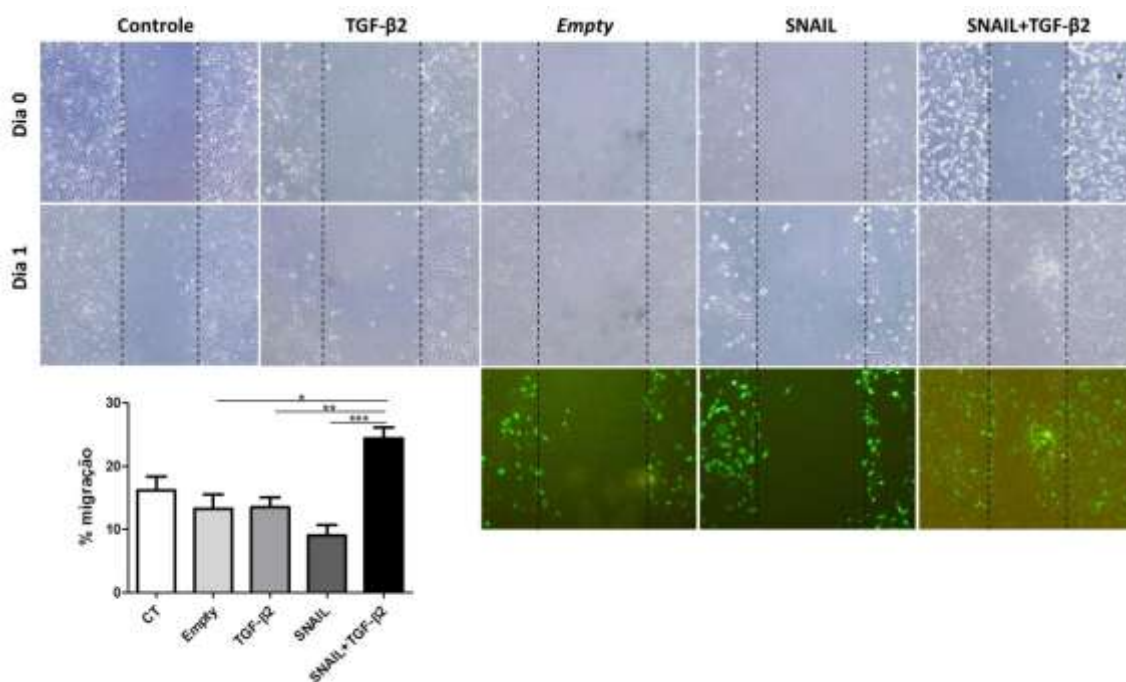


Figura 22. Análise da motilidade das células CAECs após indução da EndMT. A porcentagem de migração foi determinada nas amostras CAECs controles (CT), nas tratadas com TGF- β 2, transduzidas com o vetor vazio (*Empty*), transduzidas com *SNAIL* e transduzidas com *SNAIL* e tratadas com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2). As imagens foram obtidas em contraste de fase e por epifluorescência das células GFP positivas no aumento de 20x com 24 horas de indução. As barras do gráfico representam a porcentagem de migração das células. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6. Expressão dos microRNAs durante a EndMT

6.1 Seleção e análise dos microRNAs envolvidos com a EndMT

Com a finalidade de avaliar a participação dos microRNAs (miRNAs) na indução da EndMT, foi realizada uma revisão na literatura de acordo com este contexto. Posteriormente, os miRNAs que apresentaram papel significativo na indução da EMT ou que estavam relacionados com alguma via de sinalização indutoras desse processo, foram selecionados e analisados quanto aos níveis de expressão durante a indução da EndMT.

Doze miRNAs foram avaliados nas CAECs nos diferentes grupos de indução (CT, *Empty*, TGF- β 2, *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2), incluindo miR-let7a, miR-10a, miR-26a, miR-29a, miR-34a, miR-125b, miR-145, miR-146a, miR-200b, miR-200c, miR-221 e miR-222. Conforme observado na Figura 23, somente o miR-let7a foi significativamente expresso no grupo *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2 comparado com o grupo *Empty* ($p < 0,05$). Dessa forma, visto que o miR-let7a altera sua expressão durante a EndMT e que esse processo é mais proeminente no grupo *SNAIL*+TGF- β 2, a perda e ganho de função do miR-let7a foi avaliada no grupo *SNAIL*+TGF- β 2.

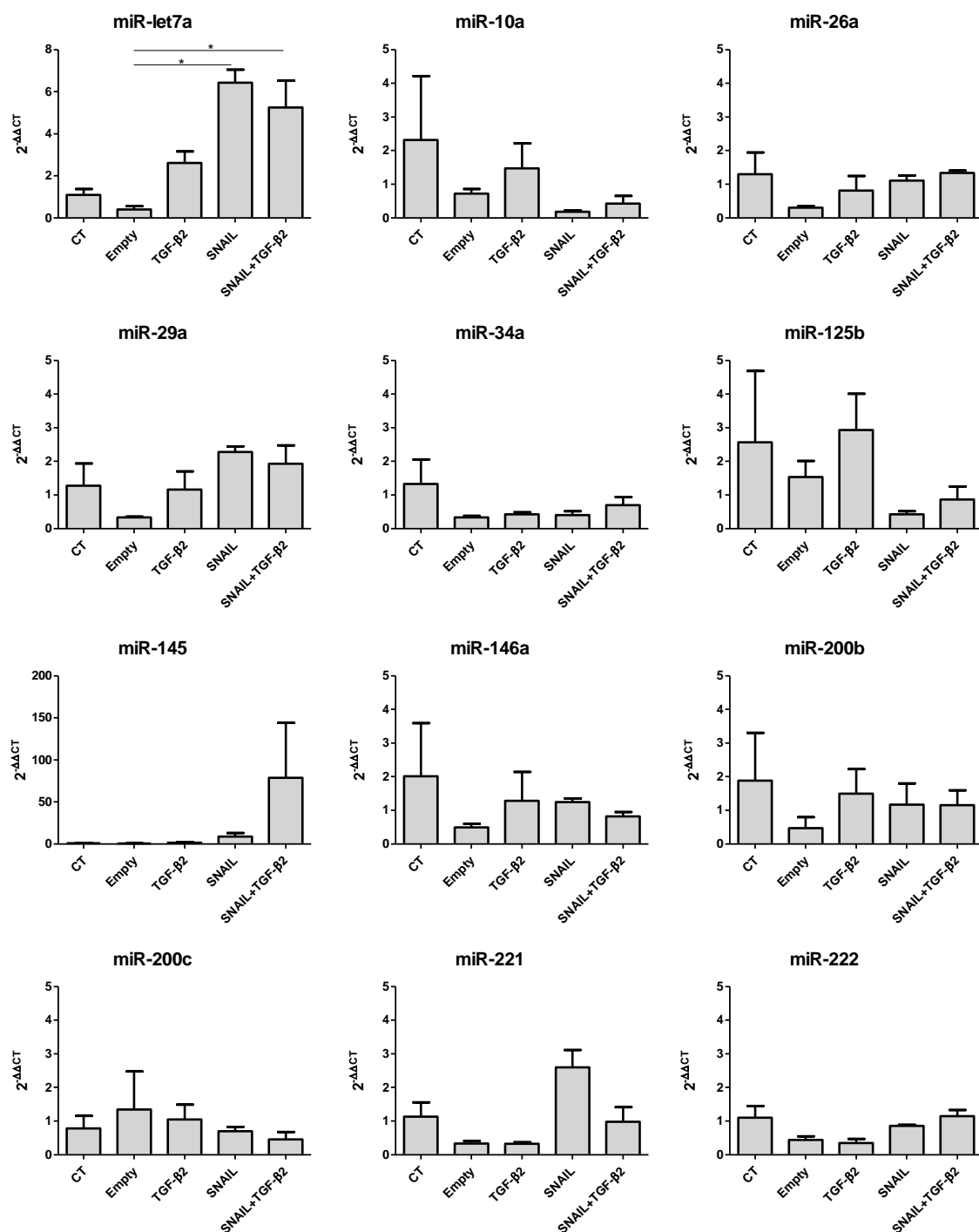


Figura 23. Quantificação da expressão dos microRNAs (miRNAs) envolvidos na EMT nas células CAECs após indução da EndMT, utilizando PCR em tempo real. A expressão relativa foi determinada nas amostras CAECs controles (CT), nas tratadas com TGF-β2, transduzidas com o vetor vazio (*Empty*), transduzidas com *SNAIL* e transduzidas com *SNAIL* e tratadas com TGF-β2 (*SNAIL+TGF-β2*). As barras representam os valores da expressão relativa obtida a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. *p<0,05.

6.2 Ensaio funcional para o miR-let7a

A indução com o *mimics* pré-miR-let7a e a inibição com o anti-miR-let7a nas CAECs foi certificada por meio da expressão do miR-let7a por qPCR nestas células. A Figura 24 demonstra que a transfecção do pré-miR-let7a nas CAECs controle (CT Pré) e *SNAIL*+TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2 Pré) aumenta a expressão do miR-let7a, ao passo que a transfecção do anti-miR-let7a diminui sua expressão nos dois tempos de indução avaliados (1 e 2 dias), comprovando que houve o ganho e a perda de função do miR-let7a.

Após comprovar que o miR-let7a teve sua expressão controlada, foi avaliado se esta molécula poderia regular a expressão de algum marcador endotelial ou mesenquimal e assim ocasionar a EndMT. Desse modo, a expressão dos genes *CD31*, *CDH5*, *KRT19*, *FNI*, *COL1A1*, *FSP1*, *CD90* e *NOTCH3* foi avaliada por qPCR.

Conforme observado na Figura 24, a expressão dos marcadores endoteliais e mesenquimais não foi alterada significativamente após a transfecção dos pré-miR-let7a e anti-miR-let7a nos dois períodos avaliados, com exceção dos marcadores mesenquimais *FSP1* e *COL1A1*. A expressão do *FSP1* estava significativamente aumentada na CAEC *SNAIL*+TGF- β 2 Anti comparada à CAEC com *SNAIL*+TGF- β 2 Pré com dois dias de cultivo. Ainda, as células *SNAIL*+TGF- β 2 Pré e *SNAIL*+TGF- β 2 Anti apresentaram um aumento de *COL1A1* comparado com o controle após um dia de indução, sugerindo que a alteração nos níveis do *COL1A1* ocorre pela indução de *SNAIL*+TGF- β 2 e não pela repressão ou indução do miR-let7a.

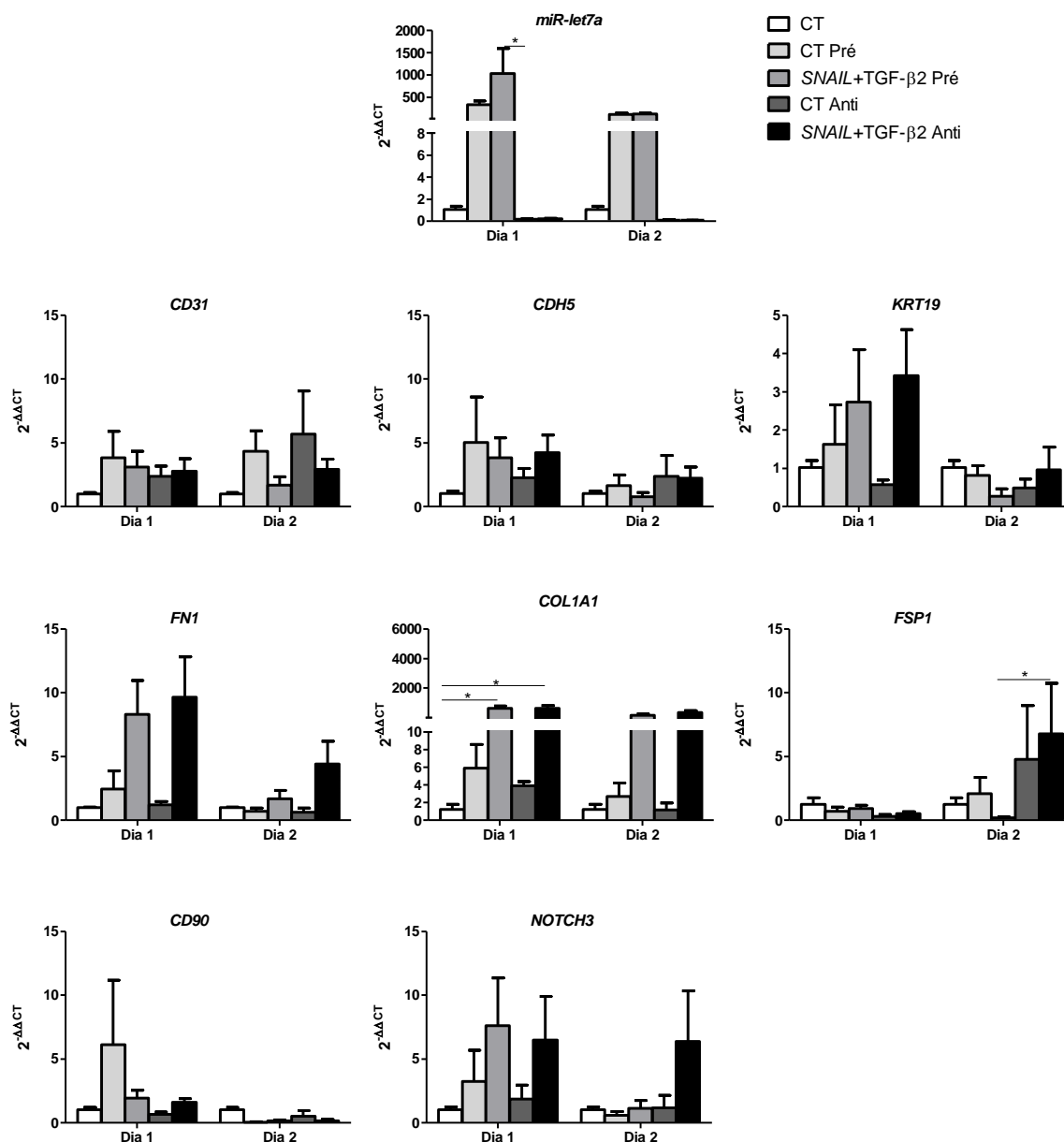


Figura 24. Quantificação relativa da expressão do miR-let7a e dos genes envolvidos na EndMT (*CD31*, *CDH5*, *KRT19*, *FN1*, *COL1A1*, *FSP1*, *CD90* e *NOTCH3*), utilizando PCR em tempo real. A expressão relativa foi determinada nas seguintes amostras: CAEC controle (CT), CAEC controle transfectada com pré-miR-let7a (CT Pré), CAEC transduzida com *SNAIL*, tratadas com TGF-β2 e transfectadas com pré-miR-let7a (*SNAIL*+TGF-β2 Pré), CAEC controle transfectada com anti-miR-let7a (CT Anti) e CAEC transduzida com *SNAIL*, tratadas com TGF-β2 e transfectadas com anti-miR-let7a (*SNAIL*+TGF-β2 Anti). As barras representam os valores da expressão relativa obtida a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. * $p < 0,05$.

Discussão

V. DISCUSSÃO

A transição epitélio-mesenquimal (EMT) foi descrita pela primeira vez em 1982 quando observaram que células epiteliais mantidas em suspensão de colágeno perdiam sua polaridade e eram capazes de adquirir características de células mesenquimais (GREENBURG; HAY, 1982). Estudos adicionais relataram uma forma importante e especializada da EMT, nomeada de transição endotélio-mesenquimal (EndMT). Desde então, os avanços nas pesquisas científicas elucidaram o papel da EndMT em diversos processos, como no desenvolvimento embrionário e no envolvimento com algumas patologias (ARCINIEGAS et al., 2005; ARMSTRONG; BISCHOFF, 2004; ZEISBERG et al., 2007a, 2008). Entretanto, os fatores relacionados com a indução da EndMT ainda não foram totalmente elucidados. Dessa forma, investigar os mecanismos moleculares envolvidos no processo da EndMT pode contribuir para uma melhor compreensão da biologia das CEs, bem como para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Na tentativa de elucidar os mecanismos moleculares relacionados à EMT e EndMT, diversos estudos evidenciaram a participação de alguns fatores de transcrição na indução da EMT, incluindo SNAIL, SLUG, TWIST1, ZEB1, ZEB2, FOXC2, KLF8 e TCF3 (BRIEGEL, 2006; MANI et al., 2008; OUYANG et al., 2010). A ativação desses fatores ocasiona a inibição da transcrição do gene da E-caderina resultando na perda das junções célula-célula e no ganho da capacidade migratória e invasiva (NIETO, 2011). Outro mecanismo molecular descrito foi a via de sinalização do TGF- β (*transforming growth factor β*) que inclui as isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 (ARMSTRONG; BISCHOFF, 2004; AZHAR et al., 2009; DO et al., 2008).

A família do TGF- β participa de diversos processos celulares, tais como diferenciação e desenvolvimento (PENG, 2003). Ademais, o TGF- β pode funcionar como supressor de tumor por inibir a proliferação celular, mas também pode promover metástase em diferentes tipos de cânceres (SIEGEL; MASSAGUÉ, 2003; TANG et al., 2003). Estudos relatam que a EndMT pode ser estimulada principalmente pela isoforma TGF- β 2 (DEISSLER et al., 2006; KOKUDO et al., 2008; LIEBNER et al., 2004; ROMANO; RUNYAN, 2000; TAVARES et al., 2006). Azhar e colaboradores (2009) realizaram o *knockdown* de TGF- β 2 em camundongos e observaram uma inibição da EndMT cardíaca, pelo fato de haver uma diminuição significativa no número de células mesenquimais. Ainda, o *knockdown* de TGF- β 1 e TGF- β 3 também foi realizado e observou-se a ocorrência da EndMT, demonstrando a importância da isoforma TGF- β 2 na indução desse processo (AZHAR et al., 2009).

No presente estudo, o fator de transcrição *SNAIL*, bem como o fator de crescimento TGF- β 2 foram utilizados para induzir a EndMT em CEs de fontes distintas, incluindo as células endoteliais de veia de cordão umbilical (PHUVEC), cardíacas (PAEC e CAEC) e pulmonar (HPAEC).

Após a indução das CEs com TGF- β 2, *SNAIL* e *SNAIL* associado ao tratamento com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2), as alterações morfológicas e moleculares foram avaliadas. Dentre todas as CEs analisadas, as CAECs foram as células que mais apresentaram alterações morfológicas, demonstrando formato fibroblastoide quando transduzidas com *SNAIL*. Essas alterações foram mais evidentes nas células CAEC *SNAIL*+TGF- β 2. Além disso, as CAECs *SNAIL*+TGF- β 2 apresentaram um aumento significativo na expressão de *FNI* comparado com as células tratadas com TGF- β 2, bem como a expressão significativamente elevada de *SM22*, *CNN1* e *CD90* nas células *SNAIL*+TGF- β 2 comparado com células *Empty*. Nenhuma diferença significativa foi observada na expressão gênica dos marcadores endoteliais *CD31* e *CDH5* nos diferentes grupos de indução da EndMT. Por outro lado, os níveis proteicos de *CD31* e *CDH5* estavam diminuídos nas CAECs induzidas com *SNAIL*+TGF- β 2. Embora alguns trabalhos relatassem a diminuição dos marcadores endoteliais durante a EndMT (KOKUDO et al., 2008; MEDICI; POTENTA; KALLURI, 2011; ZEISBERG et al., 2007a), Frid e colaboradores (2002) descreveram que as células endoteliais submetidas à EndMT co-expressaram os marcadores endotelial (*CDH5*) e mesenquimal (α -SMA) (FRID; KALE; STENMARK, 2002). A expressão de ambos os tipos de marcadores pode ser explicada pelo fato que, durante a ocorrência da EndMT, as CEs passam por um fenótipo intermediário até atingirem o fenótipo mesenquimal (KALLURI; WEINBERG, 2009; KUMARSWAMY et al., 2012a; PIERA-VELAZQUEZ; LI; JIMENEZ, 2011).

Comparando a morfologia e as alterações na expressão gênica das quatro células avaliadas (PHUVEC, HPAEC, PAEC e CAEC), as CAECs foram as células que mais mudaram o seu perfil de expressão após a indução da EndMT. Ainda não está claro na literatura se todas as células endoteliais podem sofrer EndMT, entretanto, estudos sugerem que dentre as células endoteliais cardíacas, as células endoteliais coronárias podem transitar para um fenótipo mesenquimal devido a sua plasticidade embrionária (WU et al., 2012; XU et al., 2015). Portanto, os dados do presente estudo demonstram que as CEs provenientes de diferentes localizações anatômicas apresentam graus de plasticidade distintos quando estimuladas à EndMT, visto que as mesmas possuíram respostas diferentes à indução com TGF- β 2, *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2.

O fato das CEs de fontes distintas possuírem respostas diferentes com a indução da

EndMT pode ainda ser explicado porque o endotélio apresenta um alto grau de heterogeneidade molecular, bioquímica e funcional de acordo com os órgãos de origem e o microambiente (GARLANDA; DEJANA, 1997; HEWETT, 2009; TREPPEL; ARAP; PASQUALINI, 2002). Ademais, é esperado que CEs de diferentes vasos exibissem especializações morfológica e funcional locais. Chi e colaboradores (2003) exploraram a diversidade das células endoteliais nos diferentes tipos de vasos sanguíneos e localizações anatômicas, analisando a expressão gênica global através da técnica de *microarray*. Os autores avaliaram o perfil de expressão de 53 células endoteliais e observaram que células endoteliais de vasos sanguíneos de grande calibre e células endoteliais microvasculares de diferentes tecidos têm características e perfis distintos. Ainda, foi identificado um grupo de genes característicos de endotélio arterial e venoso, comprovando que as células endoteliais de diferentes sítios anatômicos desempenham um papel na fisiologia local do seu respectivo órgão e tecido (CHI et al., 2003).

A indução da EndMT pela ação do *SNAIL* e TGF- β 2 também foi observada no trabalho de Medici e colaboradores (2011). Os autores inibiram a expressão do *SNAIL* na célula endotelial microvascular cutânea (HCMEC) utilizando siRNA e trataram com TGF- β 2 por 48 horas. Foi observado que o tratamento com TGF- β 2 induziu alterações morfológicas, condizentes com formato fibroblastoide nas células transfectadas com siRNA controle, enquanto que as células transfectadas com siRNA-*SNAIL* não apresentaram nenhuma alteração. Além disso, as análises proteicas revelaram que a inibição do *SNAIL*, juntamente com a adição de TGF- β 2, impediu a diminuição dos marcadores endoteliais VE-caderina e CD31 e o aumento dos marcadores mesenquimais FSP1 e α -SMA. Esses dados sugerem que a expressão de *SNAIL* associado ao TGF- β 2 é necessária para EndMT. Em seguida, os autores avaliaram se somente a expressão de *SNAIL* era suficiente para induzir o processo de transição. Desse modo, *SNAIL* foi superexpresso nas HCMEC, e ao contrário do presente estudo, nenhuma alteração foi observada tanto na morfologia celular quanto nos níveis de expressão dos marcadores VE-caderina, CD31, FSP1 e α -SMA (MEDICI; POTENTA; KALLURI, 2011). Esses resultados discrepantes podem ser justificados pelo fato das HCMEC serem de origem microvascular e as CAECs serem oriundas de vasos sanguíneos de grande calibre, bem como de órgãos diferentes.

Kokudo e colaboradores (2008) induziram a EndMT em células endoteliais derivadas de células-tronco embrionárias murinas pelo tratamento com TGF- β 2 e observaram uma diminuição de claudina-5, bem como um aumento na expressão dos marcadores α -SMA, SM22, CNN1 e *SNAIL*. Com o aumento da expressão de *SNAIL*, sugeriu-se que a EndMT

poderia ser induzida pelo TGF- β 2 em uma via dependente de SNAIL. Sendo assim, foi realizado o *knockdown* de SNAIL e observou-se a não ocorrência da EndMT, sugerindo que esse fator de transcrição é necessário para a indução da EndMT e pode ser um possível regulador desse processo em resposta ao tratamento com TGF- β 2 (KOKUDO et al., 2008).

Com o intuito de avaliar o potencial de indução de TGF- β 2, SNAIL e SNAIL+TGF- β 2 e o efeito que cada fator suscita nas CEs, foi realizada uma análise do perfil de expressão gênica global das CAECs após a indução da EndMT por meio da tecnologia de *microarray*. Os dados revelaram um dendrograma com dois principais agrupamentos: i) CAEC transduzidas com SNAIL e CAEC SNAIL+TGF- β 2; ii) CAEC controle, transduzidas com o vetor vazio (*Empty*) e tratadas com TGF- β 2. Em concordância com o dendrograma, ao comparar os genes diferencialmente expressos entre os diferentes grupos não foi observado nenhum gene diferencialmente expresso entre CT e TGF- β 2. Esses resultados sugerem que o fator de transcrição SNAIL ocasiona alterações significativas no transcriptoma das células, ao passo que o tratamento com TGF- β 2 sozinho não ocasiona mudanças na expressão gênica.

Paruchuri e colaboradores (2006) também não observaram nenhuma alteração nas células endoteliais após a indução com TGF- β 2. Os autores trataram as células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (HDMECs) com TGF- β 2 e observaram que as HDMECs não expressaram os marcadores α -SMA e CNN1 na ausência ou na presença de TGF- β 2. Além disso, as HDMECs controle e tratada com TGF- β 2 foram capazes de formar tubos em Matrigel, sugerindo que o TGF- β 2 não provocou nenhuma mudança funcional nas HDMECs e as mesmas continuaram com fenótipo endotelial (PARUCHURI et al., 2006). Entretanto, diversos trabalhos demonstram a indução da EndMT pelo TGF- β 2 (AZHAR et al., 2009; KOKUDO et al., 2008; MEDICI; POTENTA; KALLURI, 2011). As discrepâncias entre os resultados podem ocorrer, pois não há um protocolo padronizado para a indução da EndMT, sendo assim cada estudo utiliza uma isoforma de TGF- β para a indução, bem como doses e tempos de cultivo diferentes. Além disso, para a indução da EndMT, há estudos que isolam as células endoteliais e outros que usam linhagens endoteliais adquiridas comercialmente. Outro aspecto a ser considerado é que o meio de cultivo utilizado para a indução varia de um estudo para outro e há escassez de informações nos protocolos utilizados, tais como se há troca de meio de cultura durante o tratamento com TGF- β ou se essa citocina é adicionada sem que o meio de cultivo seja trocado. A descrição de detalhes é essencial, uma vez que a troca de meio pode ocasionar a ativação de algumas vias de sinalização. Dessa forma, os resultados podem ser distintos dependendo do tipo de protocolo utilizado para a indução da EndMT.

Sabendo que SNAIL alterou o perfil de expressão gênica das CAECs, os genes

diferencialmente expressos entre CT vs. *SNAIL* e CT vs. *SNAIL*+TGF- β 2 foram avaliados quanto a capacidade de se associarem na determinação de uma característica e formarem redes gênicas. A análise entre CT e *SNAIL* revelou uma rede contendo genes associados com organização, manutenção e função celular, desenvolvimento do sistema cardiovascular e com o câncer, dentre eles os genes *COL1A1*, *COL1A2*, *CNN1*, *TGF- β 1* e *TGF- β 2* que estavam superexpressos e o gene *KRT19* que apresentou uma expressão atenuada no grupo *SNAIL*. Os mesmos genes foram observados na rede gênica obtida na comparação entre CT e *SNAIL*+TGF- β 2, bem como os genes *FN1*, *NOTCH3* e *WNT* que estavam com a expressão elevada no grupo *SNAIL*+TGF- β 2.

Os resultados obtidos pelo *microarray* foram validados por meio da análise da expressão dos genes *COL1A1*, *COL1A2* e *KRT19* por qPCR. Conforme esperado, o grupo *SNAIL*+TGF- β 2 apresentou um aumento da expressão do *COL1A1* e *COL1A2* e uma diminuição do *KRT19*. Devido à alta expressão do *COL1A1*, essa molécula também foi avaliada por *Western blot* e os dados foram confirmados havendo uma expressão elevada no grupo *SNAIL*+TGF- β 2. Todos esses dados sugerem que a superexpressão de *SNAIL* é capaz de alterar a expressão gênica das CAECs, condizente com o processo de EndMT. Entretanto, o processo de transição é mais evidente nas células *SNAIL*+TGF- β 2 uma vez que as mesmas expressam os mesmos marcadores em níveis mais elevados, bem como a expressão de outras moléculas relacionados com a EndMT, tais como *FN1*, *NOTCH3* e *WNT*. Portanto, a associação de *SNAIL* com TGF- β 2 pode potencializar o efeito da EndMT.

Para associar esses genes diferencialmente expressos entre CT vs. *SNAIL* e CT vs. *SNAIL*+TGF- β 2 com as vias de sinalização, foi realizada uma análise utilizando o *software Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). As análises revelaram, em ambas as comparações, a via de regulação da transição epitélio-mesenquimal como uma das mais representadas, no qual é regulada principalmente por TGF- β 2, Wnt, Notch e Receptor de Tirosina Quinase. Visto que os genes *NOTCH3* e *WNT5B* estavam diferencialmente expressos na análise CT vs. *SNAIL*+TGF- β 2, os mesmos foram validados por qPCR e o aumento dessas moléculas no grupo *SNAIL*+TGF- β 2 foi confirmado.

A investigação da via de sinalização Notch na EndMT parte de conhecimentos prévios adquiridos na EMT, no qual está relacionado tanto com o desenvolvimento embrionário quanto com os processos patológicos. O coração é o primeiro órgão a ser formado durante a embriogênese e se desenvolve a partir do mesoderma cardiogênico. Em seguida, a interação entre o endocárdio e miocárdio no canal atrioventricular ocasiona a EMT das células do endocárdio para a formação das válvulas cardíacas e septo membranoso (RUNYAN;

MARKWALD, 1983). Alguns ligantes e receptores específicos de Notch são expressos no coração durante os primeiros estágios de desenvolvimento, no qual Delta4, Notch1 e Notch4 são transcritos nas células do endocárdio a partir da gastrulação (DEL AMO et al., 1992; KREBS et al., 2000; UYTTENDAELE et al., 1996).

Para avaliar o papel de Notch na EMT, Matsuno e colaboradores (2012) inicialmente induziram a EMT por meio do tratamento com TGF- β 1 nas células epiteliais e observaram uma diminuição do marcador epitelial E-caderina e um aumento dos marcadores mesenquimais vimentina, fibronectina, N-caderina e do fator de transcrição Snail. Em seguida, foi demonstrado que Snail era essencial na indução da EMT, uma vez o *knockdown* dessa molécula elevou a expressão de E-caderina. Os autores também analisaram a expressão dos receptores Notch 1-4 e dos ligantes (Delta e Jagged) e um aumento de Notch2, Notch4 e Jagged1 foi observado nas células tratadas com TGF- β 1. O *knockdown* de Notch2, Notch4 e Jagged1 foi realizado e notou-se uma diminuição de Snail. Todos esses resultados sugerem que a EMT induzida por TGF- β 1 é controlada pela via de sinalização Notch através da indução de Snail (MATSUNO et al., 2012).

O papel da via de sinalização Notch também foi demonstrado na EndMT por Nosedá e colaboradores (2004) que realizaram a superexpressão de Notch1 e Notch4 nas células endoteliais microvasculares (HMEC), HUVEC e PAEC, e observaram uma mudança morfológica e um aumento do marcador mesenquimal α -SMA, sugerindo a ocorrência da EndMT. Além disso, foi avaliado se a interação entre Notch e Jagged1 poderia induzir a EndMT. Para tanto, as HMEC foram transduzidas com o Jagged1 e notou-se uma diminuição dos marcadores endoteliais VE-caderina, PECAM-1 e Tie2 e um aumento de FN1 e α -SMA. Esses dados sugerem que a atividade de Notch é capaz de induzir a EndMT em CEs de diferentes sítios anatômicos e que a interação Notch-Jagged1 contribui para o fenótipo mesenquimal (NOSEDA et al., 2004).

Embora o envolvimento da via de sinalização Notch tenha sido demonstrada na EMT e EndMT, não há nenhum trabalho na literatura que descreva a ativação Notch3 na EndMT. No presente estudo, foi demonstrado que *NOTCH3* está superexpresso nas CAEC *SNAIL*+TGF- β 2, sugerindo que pode haver interação entre as moléculas TGF- β 2, *SNAIL* e *NOTCH3* para induzir o processo de EndMT.

A via de sinalização Wnt também foi descrita na EMT e EndMT. Essa via é iniciada com a ligação dos ligantes WNTs aos receptores, podendo ocasionar a ativação da via canônica (dependente de β -catenina) ou da via não canônica (independente de β -catenina) (CRISTANCHO; LAZAR, 2011; RAO; KÜHL, 2010).

Um estudo relatou que camundongos contendo deficiência de β -catenina na célula endotelial não ocasiona a formação dos coxins do coração. Além disso, verificou-se que a indução com TGF- β 2 nessas células não altera a expressão α -SMA, ao passo que nas células controle o tratamento com TGF- β 2 é acompanhado pela ativação de β -catenina e pela expressão aumentada de α -SMA, sugerindo que a interação entre TGF- β e a via de sinalização Wnt é necessária para a ocorrência da EndMT e para a formação dos coxins do coração (LIEBNER et al., 2004)

Lee e colaboradores (2015) avaliaram se os fibroblastos presentes no queuloide poderiam ser de origem endotelial e se a via de sinalização Wnt poderia estar envolvida nesse processo. Para tanto, as células endoteliais foram tratadas com Wnt-3a e observou-se além de uma mudança morfológica, uma diminuição de VE-caderina e um aumento de vimentina, α -SMA e Slug após cinco dias de tratamento. Esses dados sugerem que Wnt-3a ocasiona a transição da célula endotelial para o fenótipo mesenquimal contribuindo, portanto, para a formação de queuloide e cicatrizes hipertróficas (LEE et al., 2015).

No presente estudo, foi observado uma superexpressão do gene *WNT5B* nas células CAEC *SNAIL*+TGF- β 2. Sabendo que *WNT5B* pode inibir a via canônica Wnt dependente de β -catenina (KANAZAWA et al., 2005), a expressão de β -*CATENINA* foi avaliada por qPCR e nenhuma diferença foi observada. Dessa forma, esses resultados sugerem que a EndMT induzida por *SNAIL*+TGF- β 2 nas CAECs pode ser mediada pela via Wnt não canônica. Entretanto, para a confirmação desses dados, seria necessário analisar a fosforilação dessas proteínas por meio da técnica de *Western blot*.

Vários marcadores e vias de sinalização têm sido usados para demonstrar a ocorrência da EMT e EndMT (ABU EL-ASRAR et al., 2015; LI et al., 2011; MEDICI; KALLURI, 2012; SAITO, 2013; ZEISBERG et al., 2007a). Entretanto, não só a expressão dos marcadores e das vias de sinalização devem ser avaliados para caracterizar a EndMT, mas uma série de parâmetros precisam ser considerados. Um estudo destacou os pontos relevantes que devem ser observados na EMT *in vitro*, dentre eles o aumento da expressão dos marcadores mesenquimais FSP1, COL1A1, COL1A2 e vimentina, ausência de marcadores epiteliais, perda de citoqueratina ou ZO-1, expressão dos fatores de transcrição SNAIL, SLUG e TWIST, morfologia fibroblastoide, perda da polaridade, resistência a apoptose e capacidade migratória (ZEISBERG; NEILSON, 2009). Nesse sentido, para comprovar a ocorrência da EndMT nas CAEC *SNAIL*+TGF- β 2, a capacidade de formação de estruturas semelhantes à túbulos capilares, bem como a capacidade migratória foram avaliadas nessas células.

Conforme esperado, no ensaio de formação de túbulos capilares tanto as CAEC

controle quanto as induzidas com o vetor vazio (*Empty*) foram capazes de formar estruturas complexas semelhantes a redes vasculares. Contudo, as CAECs induzidas com os fatores TGF- β 2, *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2 não foram capazes de formar as estruturas semelhantes aos capilares, sugerindo que os fatores de indução da EndMT alteraram essa característica da célula endotelial.

Em relação ao ensaio de migração, as CAEC *SNAIL*+TGF- β 2 migraram significativamente quando comparadas com *Empty*, TGF- β 2 e *SNAIL*. Esse resultado condiz com os descritos na literatura, nos quais a indução da EndMT origina uma célula mesenquimal com característica migratória (GONZALEZ; MEDICI, 2014; POTENTA; ZEISBERG; KALLURI, 2008; RANCHOUX et al., 2015).

Após determinar a ocorrência da EndMT nas CAEC *SNAIL*+TGF- β 2, foi questionado se algum mecanismo molecular poderia estar envolvido nesse processo e assim controlar a EndMT, tais como os miRNAs. Desse modo, foi realizado um levantamento na literatura dos miRNAs associados com a EMT e EndMT, bem como os relacionados com alguma via de sinalização indutora das transições.

Foram selecionados 12 miRNAs que tiveram sua expressão mensurada por qPCR, incluindo miR-let7a, miR-10a, miR-26a, miR-29a, miR-34a, miR-125b, miR-145, miR-146a, miR-200b, miR-200c, miR-221 e miR-222. O miR-let7a foi o único que apresentou uma expressão significativa nos grupos *SNAIL* e *SNAIL*+TGF- β 2 comparado com o grupo *Empty*. Com o objetivo de avaliar o efeito do miR-let7a na EndMT, foi realizado o ensaio de perda e ganho de função no grupo *SNAIL*+TGF- β 2, mas a repressão ou a indução do miR-let7a não alterou a EndMT, sugerindo que o miR-let7a não participa desse processo.

Durante os últimos anos, o papel dos miRNAs na regulação da EMT e nas vias de sinalização associadas a esse processo têm sido observado em vários contextos de tumores humanos, dentre eles o miR-10b (MA; TERUYA-FELDSTEIN; WEINBERG, 2007), miR-26a (DONG et al., 2014; TIAN et al., 2013), miR-29 (RU et al., 2012), miR-34 (LIU et al., 2011; SIEMENS et al., 2011; XU et al., 2014), miR-let7 (YU et al., 2007), miR-145 (HU et al., 2014) e miR-146a (ZHONG et al., 2010).

A família miR-200 que inclui os miRNAs miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c e miR-429 apresentou uma baixa expressão durante a EMT induzida com TGF- β e foi demonstrado que esses miRNAs regulam a EMT por controlarem a expressão do fator de transcrição ZEB1 (GREGORY et al., 2008). O miR-221/222 também regula a EMT diminuindo a expressão dos marcadores epiteliais, aumentando os marcadores mesenquimais, bem como a migração e invasão celular (STINSON et al., 2011).

Sabendo que o fator de transcrição Snail está relacionado com a EMT, Kumarswamy e colaboradores (2012) analisaram, por meio de ferramentas de bioinformática, os possíveis miRNAs que tem como alvo o fator de transcrição Snail e observaram que o miR-30a era um possível candidato. Para comprovar que Snail era alvo do miR-30a, foi realizada a transfecção do pré-miR-30a em células de câncer de pulmão e notou-se uma inibição do Snail, sugerindo que miR-30a pode controlar a expressão desse fator de transcrição. Além disso, a expressão do miR-30a relacionou-se positivamente e negativamente com a expressão de E-caderina e N-caderina, respectivamente, e observou-se que células com altos níveis de E-caderina e miR-30a apresentaram baixa expressão de Snail e consequentemente inibição da invasão e metástase. Esses dados sugerem que o miR-30a inibe a EMT por ter alvo no Snail (KUMARSWAMY et al., 2012b).

Um estudo realizou a análise de expressão em larga escala dos miRNAs durante o processo de EndMT por meio da técnica de *microarray*. Foi demonstrado que os miR-125b, let-7c, let-7g, miR-21, miR30b e miR-195 estavam superexpressos e os miR-122a, miR-127, miR-196 e miR-375 estavam diminuídos durante a EndMT. Ainda, foi observado que altos níveis de miR-125b diminui a expressão de p53, o principal alvo do miR-125b e regulador negativo de TGF- β , o qual p53 foi significativamente suprimido ocasionando o elevado nível de α -SMA (GHOSH et al., 2012).

Kumarswamy e colaboradores (2012) demonstraram que miR-21 está envolvido no processo de EndMT mediada por TGF- β via PTEN/Akt, ocasionando um aumento da fibrose cardíaca (KUMARSWAMY et al., 2012a). Ademais, o papel do miR-23 foi avaliado durante a EndMT induzida por TGF- β . Para tanto, as células endoteliais embrionárias murinas foram tratadas com TGF- β por dois dias e notou-se um aumento na expressão de α -SMA, *SNAIL* e *FNI*, e uma diminuição de CD31, bem como uma mudança morfológica, condizente com formato fibroblastoide. A participação do miR-23 na EndMT foi comprovada através da transfecção do miR-23 *mimics*, o qual não alterou a morfologia das células e não aumentou a expressão dos marcadores α -SMA e *SNAIL*, sugerindo que o miR-23 inibe a EndMT induzida por TGF- β (LAGENDIJK et al., 2011).

O fato dos miRNAs associados com a EMT não terem apresentado uma expressão significativa no presente estudo pode ser justificado pelos diferentes contextos analisados, ou seja, a maioria dos trabalhos descrevem o papel dos miRNAs em uma situação patológica, ao passo que nesse trabalho foi investigado o papel dessas moléculas no contexto fisiológico. Ainda, pode haver outros miRNAs relacionados que não foram avaliados nesse projeto. Dessa forma, estudos adicionais são necessários para elucidar o papel dos miRNAs na EndMT.

Conclusão



VI. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que as células endoteliais de fontes anatômicas distintas apresentam respostas diferentes quando estimuladas a sofrerem EndMT por meio dos fatores indutores da EMT. A associação entre o fator de transcrição *SNAIL* e o fator de crescimento TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2) induziu a EndMT na linhagem de célula endotelial da artéria coronária (CAEC), caracterizada pela diminuição dos marcadores endoteliais CD31 e CDH5, e aumento dos marcadores mesenquimais *COL1A1*, *COL1A2*, *FN1* e *CNN1*, bem como um aumento da capacidade de migração celular. Ademais, a EndMT induzida por *SNAIL*+TGF- β 2 nas CAECs pode ser mediada pelas vias de sinalização Notch e Wnt não canônica devido ao alto nível de expressão dos genes *NOTCH3* e *WNT5B* (Figura 25).

Embora existam similaridades nos mecanismos moleculares que controlam os processos de EMT e EndMT, os miRNAs avaliados não mostraram participação na indução EndMT.

Portanto, o presente trabalho contribui para o entendimento dos mecanismos que controlam a EndMT e ajuda na compreensão da biologia das CEs. Esses dados podem auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra as doenças associadas à EndMT, como fibrose e câncer.

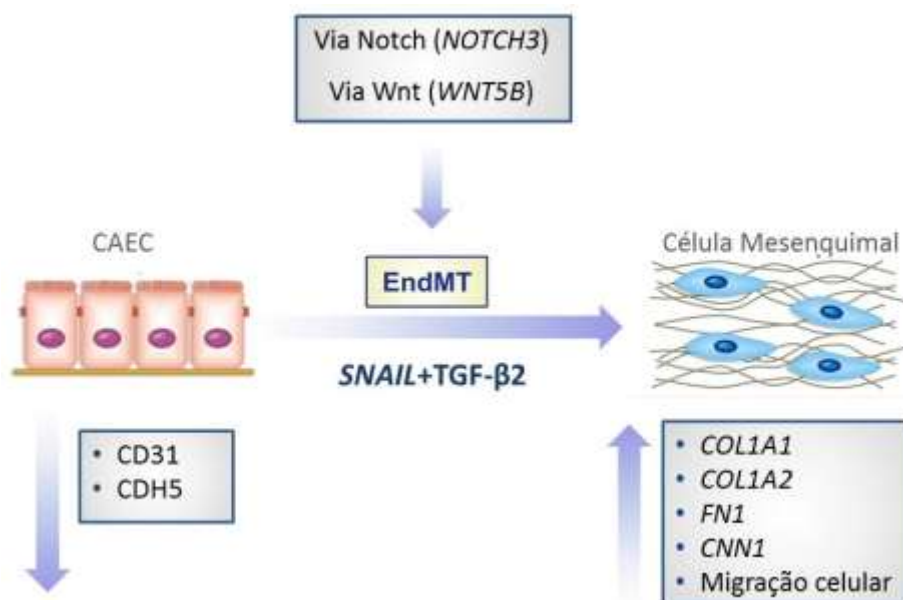


Figura 25. Esquema das alterações celulares obtidas no presente estudo durante o processo de transição endotélio-mesenquimal (EndMT). A linhagem de célula endotelial da artéria coronária (CAEC) foi induzida pela superexpressão do fator de transcrição *SNAIL* associado ao tratamento com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- β 2). Essa indução resultou na diminuição das proteínas CD31 e CDH5, no aumento dos genes mesenquimais *COL1A1*, *COL1A2*, *FN1*, *CNN1* e no aumento da capacidade migratória. Ainda, níveis elevados de *NOTCH3* e *WNT5B* foram observados, sugerindo a participação das vias de sinalização Notch e Wnt durante a transição.

Referências Bibliográficas

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with imageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36–41, 2004.

ABU EL-ASRAR, A. M. et al. Myofibroblasts in proliferative diabetic retinopathy can originate from infiltrating fibrocytes and through endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT). **Experimental Eye Research**, v. 132, p. 179–189, 2015.

AISAGBONHI, O. et al. Experimental myocardial infarction triggers canonical Wnt signaling and endothelial-to-mesenchymal transition. **Disease models & mechanisms**, v. 4, n. 4, p. 469–483, 2011.

ARCINIEGAS, E. et al. Endothelial-mesenchymal transition occurs during embryonic pulmonary artery development. **Endothelium : journal of endothelial cell research**, v. 12, n. 4, p. 193–200, 2005.

ARCINIEGAS, E. et al. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 293, n. 1, p. L1–L8, 2007.

ARMSTRONG, E. J.; BISCHOFF, J. Heart valve development: Endothelial cell signaling and differentiation. **Circulation Research**, v. 95, n. 5, p. 459–470, 2004.

ARTAVANIS-TSAKONAS, S.; RAND, M. D.; LAKE, R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5415, p. 770–776, 1999.

AVIZIENYTE, E. et al. The Src-induced mesenchymal state in late-stage colon cancer cells. **Cells Tissues Organs**, v. 179, n. 1-2, p. 73–80, 2005.

AZHAR, M. et al. Ligand-specific function of transforming growth factor beta in epithelial-mesenchymal transition in heart development. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 238, n. 2, p. 431–442, 2009.

BACHELDER, R. E. et al. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of cell biology**, v. 168, n. 1, p. 29–33, 2005.

BERANEK, J. T. Vascular endothelium-derived cells containing smooth muscle actin are present in restenosis. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, 1995.

BRAY, S.; FURRIOLS, M. Notch pathway: Making sense of suppressor of hairless. **Current Biology**, 2001.

BRAY, S. J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 7, n. 9, p. 678–689, 2006.

BRIEGEL, K. J. Embryonic transcription factors in human breast cancer. **IUBMB life**, v. 58, n. 3, p. 123–132, 2006.

CASTILLA, M. Á. et al. Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma. **Journal of Pathology**, v. 223, n. 1, p. 72–80, 2011.

CHEUNG, V. G. et al. Making and reading microarrays. **Nature genetics**, v. 21, n. 1 Suppl, p. 15–19, 1999.

CHI, J.-T. et al. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 19, p. 10623–10628, 2003.

CRISTANCHO, A. G.; LAZAR, M. A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 11, p. 722–734, 2011.

DALMA-WEISZHAUSZ, D. D. et al. The Affymetrix GeneChip Platform: An Overview. **Methods in Enzymology**, 2006.

DE CAESTECKER, M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2004.

DEISSLER, H. et al. TGFbeta induces transdifferentiation of iBREC to alphaSMA-expressing cells. **International journal of molecular medicine**, v. 18, n. 4, p. 577–582, 2006.

DEL AMO, F. F. et al. Expression pattern of Motch, a mouse homolog of Drosophila Notch, suggests an important role in early postimplantation mouse development. **Development (Cambridge, England)**, v. 115, n. 3, p. 737–744, 1992.

DJURANOVIC, S.; NAHVI, A.; GREEN, R. A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. **Science (New York, N.Y.)**, v. 331, n. 6017, p. 550–553, 2011.

DO, T.-V. et al. Transforming growth factor-beta1, transforming growth factor-beta2, and transforming growth factor-beta3 enhance ovarian cancer metastatic potential by inducing a Smad3-dependent epithelial-to-mesenchymal transition. **Molecular cancer research : MCR**, v. 6, n. 5, p. 695–705, 2008.

DONG, P. et al. The impact of microRNA-mediated PI3K/AKT signaling on epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness in endometrial cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 231, 2014.

DYKXHOORN, D. M. MicroRNAs and metastasis: Little RNAs go a long way. **Cancer Research**, 2010.

EISENBERG, L. M.; MARKWALD, R. R. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. **Circulation research**, v. 77, n. 1, p. 1–6, 1995.

FABIAN, M. R.; SONENBERG, N.; FILIPOWICZ, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. **Annual review of biochemistry**, v. 79, p. 351–379, 2010.

FIDLER, I. J.; ELLIS, L. M. Neoplastic angiogenesis--not all blood vessels are created equal. **The New England journal of medicine**, v. 351, n. 3, p. 215–216, 2004.

FRID, M. G.; KALE, V. A.; STENMARK, K. R. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: In vitro analysis. **Circulation Research**, v. 90, n. 11, p. 1189–1196, 2002.

FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Tumor microenvironment abnormalities: Causes, consequences, and strategies to normalize. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2007.

GARLANDA, C.; DEJANA, E. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 17, n. 7, p. 1193–1202, 1997.

GHOSH, A. K. et al. Molecular basis of cardiac endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT): Differential expression of microRNAs during EndMT. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 1031–1036, 2012.

GONZALEZ, D. M.; MEDICI, D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. **Science Signaling**, v. 7, n. 344, 2014.

GREENBURG, G.; HAY, E. D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. **Journal of Cell Biology**, v. 95, n. 1, p. 333–339, 1982.

GREGORY, P. A et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. **Nature cell biology**, v. 10, n. 5, p. 593–601, 2008.

HASHIMOTO, N. et al. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 43, n. 2, p. 161–172, 2010.

HE, J. et al. Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease. **Clinical and Experimental Nephrology**, 2013.

HEWETT, P. W. Vascular endothelial cells from human micro- and macrovessels: isolation, characterisation and culture. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 467, p. 95–111, 2009.

HIGGINS, D. F. et al. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 7, n. 9, p. 1128–1132, 2008.

HU, J. et al. MiR-145 regulates cancer stem-like properties and epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma-initiating cells. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 35, n. 9, p. 8953–61, 2014.

HUANG, Q. et al. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. **Nature cell biology**, v. 10, n. 2, p. 202–210, 2008.

JIANG, J.; TANG, Y. L.; LIANG, X. H. EMT: A new vision of hypoxia promoting cancer progression. **Cancer Biology and Therapy**, 2011.

JIANG, X. et al. MicroRNAs and the regulation of fibrosis. **FEBS Journal**, 2010.

JOGLEKAR, M. V. et al. The miR-30 family microRNAs confer epithelial phenotype to human pancreatic cells. **Islets**, v. 1, n. 2, p. 137–147, 2009.

JOUTEL, A; TOURNIER-LASSERVE, E. Notch signalling pathway and human diseases. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 9, n. 6, p. 619–625, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2009.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 2009.

KANAZAWA, A. et al. Wnt5b partially inhibits canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway and promotes adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, n. 2, p. 505–510, 2005.

KOKUDO, T. et al. Snail is required for TGF β -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. **Journal of cell science**, v. 121, n. Pt 20, p. 3317–3324, 2008.

KOMIYA, Y.; HABAS, R. Wnt signal transduction pathways. **Organogenesis**, v. 4, n. 2, p. 68–75, 2008.

KONG, W. et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 22, p. 6773–6784, 2008.

KOPAN, R.; ILAGAN, M. X. G. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. **Cell**, 2009.

KREBS, L. T. et al. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. **Genes and Development**, v. 14, n. 11, p. 1343–1352, 2000.

KUMARSWAMY, R. et al. Transforming growth factor- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition is partly mediated by MicroRNA-21. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 2, p. 361–369, 2012a.

KUMARSWAMY, R. et al. MicroRNA-30a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Snail and is downregulated in non-small cell lung cancer. **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 9, p. 2044–2053, 2012b.

KURAHARA, H. et al. Epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal-epithelial transition via regulation of ZEB-1 and ZEB-2 expression in pancreatic cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 105, n. 7, p. 655–661, 2012.

- LAGENDIJK, A. K. et al. MicroRNA-23 restricts cardiac valve formation by inhibiting has2 and extracellular hyaluronic acid production. **Circulation Research**, v. 109, n. 6, p. 649–657, 2011.
- LEE, J. M. et al. The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease. **Journal of Cell Biology**, 2006.
- LEE, W. J. et al. Endothelial-to-Mesenchymal Transition induced by Wnt 3a in Keloid pathogenesis. **Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, p. n/a–n/a, 2015.
- LEVA, G. DI; CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNAs: Fundamental facts and involvement in human diseases. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, 2006.
- LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 15–20, 2005.
- LI, H. et al. Snail involves in the transforming growth factor β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- LIEBNER, S. et al. β -Catenin Is Required for Endothelial-Mesenchymal Transformation During Heart Cushion Development in the Mouse. **Journal of Cell Biology**, v. 166, n. 3, p. 359–367, 2004.
- LIPTON, B. H.; BENSCH, K. G.; KARASEK, M. A. Histamine-modulated transdifferentiation of dermal microvascular endothelial cells. **Experimental cell research**, v. 199, n. 2, p. 279–291, 1992.
- LIU, C. et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, p. 211–215, 2011.
- LIU, Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. **Nature Reviews Nephrology**, 2011.
- LU, X.; KANG, Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: Master regulators of metastasis. **Clinical Cancer Research**, 2010.
- MA, L.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; WEINBERG, R. A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. **Nature**, v. 449, n. 7163, p. 682–688, 2007.
- MACDONALD, B. T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. **Developmental Cell**, 2009.
- MANI, S. A. et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704–715, 2008.
- MAO, J. et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. **Molecular Cell**, v. 7, n. 4, p. 801–809, 2001.

MARKWALD, R. R.; FITZHARRIS, T. P.; MANASEK, F. J. Structural development of endocardial cushions. **The American journal of anatomy**, v. 148, n. 1, p. 85–119, 1977.

MATSUNO, Y. et al. Notch signaling mediates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through the induction of Snai1. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 44, n. 5, p. 776–789, 2012.

MEDICI, D.; KALLURI, R. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 5-6, p. 379–384, 2012.

MEDICI, D.; POTENTA, S.; KALLURI, R. Transforming growth factor- β 2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling. **The Biochemical journal**, v. 437, n. 3, p. 515–520, 2011.

NAM, Y. et al. Structural requirements for assembly of the CSL intracellular Notch1 Mastermind-like 1 transcriptional activation complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 23, p. 21232–21239, 2003.

NAM, Y. et al. Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. **Cell**, v. 124, n. 5, p. 973–983, 2006.

NATH, B.; SZABO, G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: Diverse roles in liver diseases. **Hepatology**, 2012.

NIETO, M. A. The early steps of neural crest development. **Mechanisms of Development**, 2001.

NIETO, M. A. The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 347–376, 2011.

NOSEDA, M. et al. Notch Activation Results in Phenotypic and Functional Changes Consistent with Endothelial-to-Mesenchymal Transformation. **Circulation Research**, v. 94, n. 7, p. 910–917, 2004.

OUYANG, G. et al. Molecular signaling of the epithelial to mesenchymal transition in generating and maintaining cancer stem cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 15, p. 2605–2618, 2010.

PARUCHURI, S. et al. Human pulmonary valve progenitor cells exhibit endothelial/mesenchymal plasticity in response to vascular endothelial growth factor-A and transforming growth factor-beta2. **Circulation research**, v. 99, n. 8, p. 861–869, 2006.

PENG, C. The TGF-beta superfamily and its roles in the human ovary and placenta. **Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC**, v. 25, n. 10, p. 834–844, 2003.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 1 maio 2001.

- PIERA-VELAZQUEZ, S.; LI, Z.; JIMENEZ, S. A. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. **American Journal of Pathology**, v. 179, n. 3, p. 1074–1080, 2011.
- POTENTA, S.; ZEISBERG, E.; KALLURI, R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. **British journal of cancer**, v. 99, n. 9, p. 1375–1379, 2008.
- RANCHOUX, B. et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 131, n. 11, p. 1006–18, 2015.
- RAO, T. P.; KÜHL, M. An updated overview on wnt signaling pathways: A prelude for more. **Circulation Research**, 2010.
- REYNOLDS, A. M. et al. Targeted gene delivery of BMPR2 attenuates pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, v. 39, n. 2, p. 329–343, 2012.
- ROMANO, L. A.; RUNYAN, R. B. Slug is an essential target of TGFbeta2 signaling in the developing chicken heart. **Developmental biology**, v. 223, n. 1, p. 91–102, 2000.
- ROMERO, L. I. et al. Interleukin-1 induces major phenotypic changes in human skin microvascular endothelial cells. **Journal of cellular physiology**, v. 173, n. 1, p. 84–92, 1997.
- RU, P. et al. miRNA-29b Suppresses Prostate Cancer Metastasis by Regulating Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling. **Molecular Cancer Therapeutics**, 2012.
- RUNYAN, R. B.; MARKWALD, R. R. Invasion of mesenchyme into three-dimensional collagen gels: a regional and temporal analysis of interaction in embryonic heart tissue. **Developmental biology**, v. 95, n. 1, p. 108–114, 1983.
- SAITO, A. EMT and EndMT: regulated in similar ways? **Journal of Biochemistry**, v. 153, n. 6, p. 493–495, 2013.
- SCHENA, M. et al. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. v. 270, n. October, 1995.
- SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O₂ homeostasis. **Current Opinion in Genetics and Development**, 1998.
- SHALON, D.; SMITH, S. J.; BROWN, P. O. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. **Genome research**, v. 6, n. 7, p. 639–645, 1996.
- SHIVDASANI, R. A. MicroRNAs: Regulators of gene expression and cell differentiation. **Blood**, 2006.
- SHOOK, D.; KELLER, R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. **Mechanisms of Development**, 2003.
- SIEGEL, P. M.; MASSAGUÉ, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 11, p. 807–821, 2003.

SIEMENS, H. et al. miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. **Cell Cycle**, v. 10, n. 24, p. 4256–4271, 2011.

SIPOS, F.; GALAMB, O. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 7, p. 601–608, 2012.

SMALL, E. M.; OLSON, E. N. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 336–342, 2011.

SPLENDORE, A. Para que existem as regras de nomenclatura genética? **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 27, n. 2, p. 148–152, 2005.

STINSON, S. et al. TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. **Science signaling**, v. 4, n. 177, p. ra41, 2011.

STURN, A. **Cluster analysis for large scale gene expression studies** Rockville, , 2000.

SUSIENKA, M. J.; MEDICI, D. Vascular endothelium as a novel source of stem cells for bioengineering. **Biomatter**, v. 3, n. 2, p. 8–11, 2013.

TANG, B. et al. TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 7, p. 1116–1124, 2003.

TAVARES, A. L. P. et al. TGF beta-mediated RhoA expression is necessary for epithelial-mesenchymal transition in the embryonic chick heart. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 6, p. 1589–1598, 2006.

TAVAZOIE, S. F. et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. **Nature**, v. 451, n. 7175, p. 147–152, 2008.

TEN DIJKE, P.; HILL, C. S. New insights into TGF-beta-Smad signalling. **Trends in biochemical sciences**, v. 29, n. 5, p. 265–273, 2004.

THIERY, J. P. et al. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871–890, 2009.

TIAN, J.; HE, H.; LEI, G. Wnt/ β -catenin pathway in bone cancers. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 35, n. 10, p. 9439–45, 2014.

TIAN, L. et al. Four microRNAs promote prostate cell proliferation with regulation of PTEN and its downstream signals in vitro. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e75885, 2013.

TREPEL, M.; ARAP, W.; PASQUALINI, R. In vivo phage display and vascular heterogeneity: Implications for targeted medicine. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2002.

UYTTENDAELE, H. et al. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. **Development (Cambridge, England)**, v. 122, n. 7, p. 2251–2259, 1996.

VAN MEETEREN, L. A.; TEN DIJKE, P. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF- β . **Cell and Tissue Research**, v. 347, n. 1, p. 177–186, 2012.

VARAMBALLY, S. et al. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 322, n. 5908, p. 1695–1699, 2008.

WU, B. et al. Endocardial cells form the coronary arteries by angiogenesis through myocardial-endocardial VEGF signaling. **Cell**, v. 151, n. 5, p. 1083–1096, 2012.

WU, L. et al. Identification of a family of mastermind-like transcriptional coactivators for mammalian notch receptors. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 21, p. 7688–7700, 2002.

XIE, X. et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. **Nature**, v. 434, n. 7031, p. 338–345, 2005.

XU, W. et al. Identifying microRNA targets in different gene regions. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. Suppl 7, p. S4, 2014.

XU, X. et al. Snail Is a Direct Target of Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF1 α) in Hypoxia-induced Endothelial to Mesenchymal Transition of Human Coronary Endothelial Cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 27, p. 16653–64, 2015.

YAN, L.-X. et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 14, n. 11, p. 2348–2360, 2008.

YANG, J. et al. Twist , a Master Regulator of Morphogenesis , Plays an Essential Role in Tumor Metastasis Ben Gurion University of the Negev. **Cell**, v. 117, n. 7, p. 927–939, 2004.

YU, F. et al. let-7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1109–1123, 2007.

ZEISBERG, E. M. et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. **Nature medicine**, v. 13, n. 8, p. 952–961, 2007a.

ZEISBERG, E. M. et al. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. **Cancer Research**, v. 67, n. 21, p. 10123–10128, 2007b.

ZEISBERG, E. M. et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 19, n. 12, p. 2282–2287, 2008.

ZEISBERG, M.; NEILSON, E. G. Review series personal perspective Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. v. 119, n. 6, p. 1429–1437, 2009.

ZHAO, Z. et al. Notch signaling induces epithelial-mesenchymal transition to promote invasion and metastasis in adenoid cystic carcinoma. v. 7, n. 1, p. 162–174, 2015.

ZHONG, H. et al. Targeting Smad4 links microRNA-146a to the TGF-beta pathway during retinoid acid induction in acute promyelocytic leukemia cell line. **International Journal of Hematology**, v. 92, n. 1, p. 129–135, 2010.

ZHOU, B. P. et al. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. **Nature cell biology**, v. 6, n. 10, p. 931–940, 2004.

ZHU, K. et al. MiR-302c inhibits tumor growth of hepatocellular carcinoma by suppressing the endothelial-mesenchymal transition of endothelial cells. **Scientific reports**, v. 4, p. 5524, 2014.

ZHU, L.-F. et al. Snail overexpression induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells. **Laboratory Investigation**, v. 92, n. 5, p. 744–752, 2012.

Apêndices

APÊNDICES

APÊNDICE A – Gene diferencialmente expresso na comparação entre as CAEC controle (CT) e transduzidas com o vetor vazio (*Empty*).

Genes	Log10 Fold Change
RDH16	2,19

APÊNDICE B – Lista dos 100 genes mais diferencialmente expressos na comparação CT vs. *SNAIL*.

Genes	Log10 Fold Change	Genes	Log10 Fold Change	Genes	Log10 Fold Change
RDH16	6,72	BEX1	2,70	NSG1	-1,75
C3orf83	4,62	CMPK2	2,66	FUT1	-1,77
SPINT2	4,62	SPON2	2,64	CHN1	-1,77
MX1	4,32	ENST00000433933	2,63	DNER	-1,78
IFIT1	4,25	CHRNA1	2,63	CGNL1	-1,80
XLOC_007191	4,23	ISG15	2,63	LCN6	-1,81
S100A2	4,11	CNN1	2,62	FLJ41200	-1,82
IFI44L	4,02	EDN2	2,61	CASP5	-1,82
MMP24	3,96	UBD	2,59	UNC5B-AS1	-1,84
GAL	3,94	OAS1	2,59	ENO2	-1,86
CD69	3,93	BAIAP2L1	2,57	METTL7A	-1,88
LCN15	3,74	UCP2	2,56	TNFSF15	-1,93
COL1A1	3,74	CD200	2,51	BEX5	-1,97
BSPRY	3,54	BATF2	2,50	CLDN5	-2,00
RFPL4AL1	3,45	FABP4	2,48	HS3ST1	-2,01
IFI6	3,44	FAM71E1	2,46	CRTAC1	-2,02
SNAR-G2	3,37	EDIL3	-1,51	COL13A1	-2,03
IFITM1	3,32	ELFN2	-1,53	GNAZ	-2,03
SNAR-F	3,28	IL3RA	-1,55	MEDAG	-2,08
SNAR-D	3,22	LINC00520	-1,55	TMEM106C	-2,10
SNAR-H	3,21	RNASE4	-1,55	SYBU	-2,10
RNF112	3,15	FAM110D	-1,58	NTN4	-2,12
PLEKHA4	3,14	PRSS2	-1,60	NQO1	-2,18
EPN3	3,01	DDIT4L	-1,61	NOV	-2,20
HSD11B1	2,98	SLC7A11	-1,61	KRT19P2	-2,24
SNAR-A3	2,96	PRSS3	-1,64	ATP6V0A4	-2,27
COL1A2	2,95	ACP5	-1,64	PDGFRL	-2,59
IFIT3	2,91	CCL14	-1,67	LOX	-2,63
SNAR-B2	2,87	ECHDC2	-1,67	ADIRF	-2,86
OASL	2,86	FRAS1	-1,68	LYPD1	-2,95
SCG5	2,79	IGFBP2	-1,68	KRT19	-2,96
SERPINF1	2,77	BIRC3	-1,74	ADAMTS18	-2,99
REEP2	2,76	A_33_P3240078	-1,74		
NUPR1	2,72	LAMP3	-1,74		

APÊNDICE C – Lista dos 100 genes mais diferencialmente expressos na comparação CT vs. *SNAIL*+TGF- β 2.

Genes	Log10 Fold Change	Genes	Log10 Fold Change	Genes	Log10 Fold Change
COL1A1	7,59	SPON2	2,91	ELFN2	-1,97
RDH16	5,98	CLDN4	2,91	CDH4	-1,98
GAL	4,91	IFI44L	2,90	LINC01088	-1,98
AMTN	4,65	XLOC_004049	2,89	COL13A1	-1,99
S100A2	4,35	EPN3	2,87	IGFBP1	-2,02
SPINT2	4,24	SNAR-A3	2,86	G0S2	-2,02
CNN1	4,21	CRIP1	2,84	TCN2	-2,04
C3orf83	4,11	LBH	2,80	PSG8	-2,11
COL1A2	4,02	POSTN	2,77	TMEM106C	-2,15
FOXS1	3,86	CST6	2,77	CXCL6	-2,16
XLOC_007191	3,66	OXTR	2,72	CLDN5	-2,23
GREM1	3,59	ITGA11	2,72	NQO1	-2,25
SERPINF1	3,57	RRAD	2,69	METTL7A	-2,29
RNF112	3,56	TGFB2	2,66	XLOC_006681	-2,30
GDF6	3,54	FABP4	2,66	CSF3	-2,31
SAA1	3,43	CD200	2,66	SYBU	-2,32
LCN15	3,40	SERPIND1	-1,78	LOX	-2,37
IL11	3,34	SLC37A1	-1,79	BIRC3	-2,44
SNAR-G2	3,34	CLU	-1,79	ATP6V0A4	-2,51
BSPRY	3,33	FZD9	-1,80	CRTAC1	-2,55
RFPL4AL1	3,31	UNC5B-AS1	-1,80	CXCL2	-2,62
SNAR-D	3,25	FLJ41200	-1,81	IL8	-2,65
MMP24	3,20	DPP4	-1,83	PDGFRL	-2,71
BAIAP2L1	3,13	IL3RA	-1,86	IL1RL1	-2,72
BEX1	3,10	NSG1	-1,88	KRT19P2	-2,72
SNAR-B2	3,05	FRAS1	-1,88	IGFBP2	-2,74
MX1	3,04	ACP5	-1,91	LAMP3	-2,80
REEP2	3,03	NOV	-1,93	LYPD1	-2,90
SNAR-F	3,02	ACKR3	-1,93	ADAMTS18	-3,18
SNAR-H	3,01	CGNL1	-1,93	CXCL1	-3,32
TAGLN	2,93	GNAZ	-1,93	KRT19	-3,67
TGFBI	2,92	LINC00176	-1,93	ADIRF	-3,67
LOC729444	2,92	LCN6	-1,94		
NUPR1	2,91	BEX5	-1,95		

APÊNDICE D – Lista dos 100 genes mais diferencialmente expressos na comparação *SNAIL* vs. TGF- β 2.

Genes	Log10 Fold Change	Genes	Log10 Fold Change	ISG15	Log10 Fold Change
LOX	2,93	FLJ41200	1,79	ISG15	-2,73
LYPD1	2,91	LAMP3	1,77	IFIT3	-2,74
ADAMTS18	2,80	FRAS1	1,76	HSD11B1	-2,79
ADIRF	2,80	SYBU	1,73	CHRN1	-2,84
KRT19	2,69	LCN6	1,70	SERPINF1	-2,85
MMP1	2,61	CGNL1	1,67	SNAR-B2	-2,91
PDGFRL	2,59	LINC00520	1,63	SNAR-A3	-3,00
NOV	2,44	RNASE4	1,63	COL1A2	-3,02
BEX5	2,32	A_33_P3240078	1,61	RNF112	-3,03
BIRC3	2,26	PRSS2	1,60	RFPL4AL1	-3,18
TMEM106C	2,26	GEM	1,59	SNAR-D	-3,30
NTN4	2,20	NSG1	1,59	SNAR-H	-3,31
TNFSF15	2,18	IGFBP2	1,58	GAL	-3,41
UNC5B-AS1	2,18	SMCO4	1,57	SNAR-G2	-3,47
DDIT4L	2,17	CBR3	1,56	IFITM1	-3,56
ATP6V0A4	2,17	METTL7A	1,55	SNAR-F	-3,57
THC2529548	2,16	XAF1	-2,38	BSPRY	-3,58
DNER	2,15	ENST00000433933	-2,38	COL1A1	-3,66
CLDN5	2,12	IFI44	-2,42	CD69	-3,75
CRTAC1	2,04	APOD	-2,44	LCN15	-3,81
SLC7A11	2,04	ARHGEF16	-2,49	IFI6	-3,81
NQO1	2,03	CXCL12	-2,49	S100A2	-3,89
HS3ST1	1,99	UCP2	-2,52	ENST00000606596	-3,89
ENO2	1,95	SCG5	-2,52	IFI44L	-4,06
KRT19P2	1,95	UBD	-2,53	MMP24	-4,12
MEDAG	1,93	EDN2	-2,54	FOS	-4,19
IL3RA	1,92	FOSB	-2,54	C3orf83	-4,25
CSF3	1,92	CMPK2	-2,56	SPINT2	-4,29
COL13A1	1,90	OASL	-2,57	XLOC_007191	-4,29
ECHDC2	1,88	XLOC_005617	-2,58	IFIT1	-4,31
CASP5	1,88	APOE	-2,63	MX1	-4,43
CHN1	1,87	PLEKHA4	-2,64	RDH16	-6,81
ACP5	1,82	OAS1	-2,66		
FUT1	1,80	EPN3	-2,69		

APÊNDICE E – Lista dos 100 genes mais diferencialmente expressos na comparação *SNAIL*+TGF- β 2 vs. TGF- β 2.

Genes	Log10 Fold Change	Genes	Log10 Fold Change	ISG15	Log10 Fold Change
ADIRF	3,60	FRAS1	1,96	SNAR-A3	-2,91
KRT19	3,40	ELFN2	1,96	SAA1	-2,91
ADAMTS18	2,98	SYBU	1,95	IFI44L	-2,95
BIRC3	2,96	C2CD4B	1,94	TGFB1	-3,03
LYPD1	2,86	COL13A1	1,86	RFPL4AL1	-3,04
LAMP3	2,83	DBNDD2	1,85	SNAR-B2	-3,09
CXCL1	2,76	ENO2	1,85	GDF6	-3,10
PDGFRL	2,71	LCN6	1,83	POSTN	-3,11
LOX	2,66	CGNL1	1,80	SNAR-H	-3,12
IGFBP2	2,65	CLU	1,79	MX1	-3,15
CSF3	2,57	FLJ41200	1,78	GREM1	-3,17
CRTAC1	2,57	GCHFR	1,77	IL11	-3,19
KRT19P2	2,43	PSG2	1,77	TAGLN	-3,22
ATP6V0A4	2,42	TCN2	1,77	SNAR-F	-3,31
MMP1	2,37	XLOC_004625	1,76	SNAR-D	-3,34
CLDN5	2,36	CBR3	1,74	MMP24	-3,36
IL8	2,34	TGFB2	-2,47	BSPRY	-3,37
TMEM106C	2,31	NUPR1	-2,50	SNAR-G2	-3,44
ACKR3	2,31	C5orf46	-2,53	RNF112	-3,44
BEX5	2,30	EPN3	-2,55	LCN15	-3,46
DDIT4L	2,23	APOE	-2,57	SERPINF1	-3,65
IL3RA	2,23	RRAD	-2,59	XLOC_007191	-3,71
IL1RL1	2,22	REEP2	-2,61	C3orf83	-3,74
CXCL2	2,17	CLDN4	-2,61	FOXS1	-3,77
NOV	2,16	GZMA	-2,64	SPINT2	-3,92
UNC5B-AS1	2,15	CRIP1	-2,64	CNN1	-3,93
DNER	2,14	TMEM100	-2,65	COL1A2	-4,09
PSG8	2,11	IFIT1	-2,66	AMTN	-4,09
NQO1	2,10	XLOC_004049	-2,66	S100A2	-4,13
ACP5	2,10	BEX1	-2,70	GAL	-4,38
CXCL6	2,09	BAIAP2L1	-2,74	RDH16	-6,08
TNFSF15	2,00	ITGA11	-2,75	COL1A1	-7,52
THC2529548	1,98	LOC729444	-2,84		
METTL7A	1,97	CHRN1	-2,86		

APÊNDICE F – Lista dos 20 genes diferencialmente expressos na comparação *SNAIL* vs. *SNAIL*+TGF- β 2.

Genes	Log10 Fold Change
AMTN	3,65
FBLN5	2,36
CLDN4	1,68
TGFBI	1,62
AMIGO2	1,46
SERPINE2	1,35
FAP	1,13
CLN8	1,03
LGALS9	-1,03
LAMP3	-1,06
IGFBP2	-1,06
TRIB1	-1,09
OAS3	-1,10
IGFBP1	-1,11
UBE2L6	-1,19
IL1RL1	-1,24
DUSP5	-1,27
IFI35	-1,30
CBLN2	-1,63
CXCL1	-1,86

Anexo



ANEXO**Anexo 1**

Aceite da Coordenação-Geral da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)

 Fundação
Hemocentro RP

Ribeirão Preto, 01 de novembro de 2012.

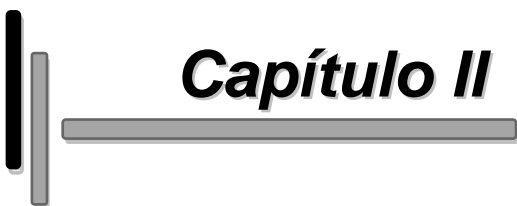
O projeto de pesquisa intitulado "Avaliação dos fatores de transcrição indutores da transição epitélio-mesenquimal (EMT) na biologia das células endoteliais", recebeu o parecer técnico **APROVADO** (Parecer Técnico CTNBio: 3258/2012) e registrado sob número de processo: **297/2012.013-02**

Lembramos que deverá ser apresentado a CIBio, o relatório final da pesquisa.


Simone Kashima Haddad
Presidente da CIBio
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto


Ilustríssimos Senhores *3/20/13*
Mariana Tomazini Pinto *P. Pinto*
Simone Kashima Haddad

79-1.07 - REV. 1 RUA TEN. CATÃO ROJO * 2501 - CEP 14051-540 - RIBEIRÃO PRETO - SP - FAX: (16) 2101-9300 - FAX: (16) 2101-9300
CNPJ 00.255.791/0001-22 - INSCR. EST. : ISENTA



Capítulo II

1. Avaliação da resposta das células endoteliais mediante a indução da EndMT pelo TGF- β e hipóxia

Neste capítulo estão descritos os resultados, em formato de artigo científico, obtidos durante o período de agosto a dezembro de 2013. Esta etapa do projeto foi realizada junto ao Departamento de Farmacologia Molecular e Celular e Instituto de Célula-Tronco Interdisciplinar, da Universidade de Miami (Flórida, EUA) e coordenado pela pesquisadora Claudia Rodrigues.

O objetivo deste trabalho foi dar continuidade as análises dos fatores indutores da EMT em células endoteliais de fontes distintas. Dessa forma, a indução da EndMT foi avaliada usando um protocolo detalhado para testar diferentes doses de isoformas de TGF (TGF- β 1 e TGF- β 2) nas células endoteliais da artéria coronária (HCAECs) e nas células endoteliais pulmonar microvascular (HMPAECs). Além disso, o mecanismo de hipóxia também foi avaliado na indução da EndMT.

Differential Response of Tissue-Specific Endothelial Cells to TGF- β and Hypoxia-Induced Endothelial-Mesenchymal Transition

Short-title: Cell Type-Dependent Endothelial-Mesenchymal Transition

Mariana T. Pinto^{1,2,3}, Dimas T. Covas^{2,4}, Simone Kashima^{2,3} and Claudia O. Rodrigues^{1,5*}

¹Interdisciplinary Stem Cell Institute, University of Miami Leonard M. Miller School of Medicine, Miami, Florida, 33136, USA

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular e Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, SP, Brazil

³Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

⁴Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

⁵Department of Molecular and Cellular Pharmacology, University of Miami Leonard M. Miller School of Medicine, Miami, Florida, 33136, USA.

*Please send correspondence to:

Dr. Claudia O. Rodrigues

Interdisciplinary Stem Cell Institute

University of Miami Miller School of Medicine

Biomedical Research Building

1501 NW 10th Avenue, Room 826

Miami, FL, 33136, USA

Tel: (305) 439-1031; Fax: (305) 243-3906

E-mail: crodrigues@miami.edu

Keywords: Endothelial-mesenchymal transition, TGF- β , Hypoxia

Abstract

Aims: Endothelial-Mesenchymal-Transition (EndMT) plays an essential role in cardiovascular development, and recently became an attractive therapeutic target based on evidence supporting its involvement in fibrosis and cancer. An important question that remains to be answered is if similar EndMT mechanisms occur in different organs, under physiological and pathological conditions, considering the diversity of endothelial cells. The assumption that TGF- β isoforms play similar roles on the induction of EndMT, and endothelial cells of different species, tissues and age respond to TGF- β equally, limits progress in the field. The aim of this study was to compare the induction of EndMT by TGF- β isoforms in endothelial cells of different sources, and define a detailed protocol for EndMT assessment *in vitro*.

Methods and Results: We compared the dose-dependent effect of TGF- β isoforms, under normoxia and hypoxia, on the induction of EndMT in human coronary and pulmonary artery endothelial cells. Our results demonstrate that depending on their origin, endothelial cells undergo spontaneous EndMT with time in culture. In addition, the effect of TGF- β on the induction of EndMT is intrinsic to the TGF- β isoform, dose and endothelial cell type. Furthermore, hypoxia alone may be used as a potent inducer of EndMT.

Conclusions: Our work suggests that the response of endothelial cells to TGF- β is intrinsic to the cell source. Optimization of induction conditions may be essential, as pathways triggering EndMT may vary during development and different pathological conditions. Therefore, caution is needed regarding indiscriminate use of TGF- β to induce EndMT for mechanistic studies.

1. Introduction

Endothelial-mesenchymal transition (EndMT) is a physiological process that involves phenotypical alterations in vascular endothelial cells leading to their conversion into cells with mesenchymal characteristics that can give rise to fibroblasts^{1, 2}. EndMT plays an essential role in cardiovascular development, and was first described during endocardial cushion formation³. However, it has gained clinical relevance after discovery of its participation in fibrotic diseases of the kidney, heart and lung⁴⁻⁹, and also during cancer progression^{10, 11}.

Similar to the analogous process of epithelial-mesenchymal transition (EMT), EndMT is characterized by loss of cell-cell adhesion and cytoskeletal alterations, leading to changes in cell morphology and acquisition of invasive and migratory properties^{1, 2}. During EndMT, the expression of the endothelial markers vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), CD31 and von willebrand factor (vWF), has been reported to be reduced, and followed by an increase in the expression of the mesenchymal and smooth muscle markers vimentin, fibronectin, fibroblast-specific protein-1 (FSP-1), alpha-smooth muscle actin (α -SMA), SM22- α and calponin^{1, 2}. Mechanistic studies have demonstrated the involvement of different growth and pro-inflammatory factors on the induction of EndMT, although a special role has been assigned to members of the transforming growth factor- β (TGF- β) family¹²⁻¹⁵. Since then, TGF- β has been used as the main tool to induce EndMT in molecular studies.

The clinical relevance of EndMT in different fibrotic conditions and its potential targeting has been well established^{1, 2}. Mechanistic studies are essential for progress in the field, and have been limited by the lack of an optimized and detailed EndMT induction approach, which could be used by different research groups. In fact, endothelial cells obtained from different species and tissues, and indiscriminate use of members of the TGF- β family as potent inducers of EndMT at different doses and time frames have been the standard in most studies. However, an important question to be addressed is if similar EndMT induction mechanisms occur in different tissues, especially considering the diversity of endothelial cells in different organs¹⁶ and dose-dependent role of members of the TGF- β family^{17, 18}. The aim of the present work was to evaluate the induction of EndMT using a detailed protocol to test the effect of different doses of TGF- β in two distinct endothelial cell lines of human origin. In addition, we tested the effect of hypoxia on the induction of EndMT, as ischemia is an important trigger of tissue fibrosis, and has been shown to induce the expression of TGF- β ¹⁹⁻

2. Methods

2.1. Cells line and culture conditions

Human coronary artery (HCAEC) and microvascular pulmonary artery (HMPAEC) endothelial cells, isolated from single donors, were purchased from Lonza and maintained according to manufacturer's instruction in microvascular endothelial growth media (EGM-MV), except that they were grown on tissue culture plates coated with monomeric rat tail collagen type-I (BD Biosciences). For all experiments, 1 cell batch of HCAECs and 2 batches of HMPAECs were tested at consecutive passages in 3-4 independent experiments. All cells were used between passages 5-8 maximum, and maintained under 37°C and 5% CO₂ humidified atmosphere.

2.2. Induction of EndMT by TGF- β Treatment

HCAECs and HMPAECs were plated at a density of 2×10^5 cells in 60mm collagen coated culture dishes in EGM-MV media. A day later, the culture media was changed to remove unbound/dead cells. Two days after initial plating, cells were harvested from one dish for protein analysis to determine the baseline levels of endothelial and smooth muscle markers prior to EndMT induction. All other culture dishes were treated separately with different doses (2ng/mL, 5ng/mL, and 10ng/mL) of TGF- β 1 or TGF- β 2 (R&D Systems) every day, for a total period of 5 days. Treatment was performed without media change to avoid stimulation by other growth factors present in the culture media. At the end of 5 days, cells were harvested for protein analysis and compared to baseline. Untreated cells harvested at the end of 5 days were used as control.

2.3. Induction of EndMT by Hypoxia Exposure

HCAECs and HMPAECs were plated and treated essentially as described above for the TGF- β EndMT induction protocol. Two days after initial plating and collection of baseline lysates, cells were randomly divided in two groups, one incubated under hypoxia (1% O₂) in a hypobaric chamber (Coy Laboratory Products), and the other one maintained under room air condition at 21% O₂ (normoxia control). In both cases cells were maintained for a total period of 5 days without media change. At the end of 5 days, cells were harvested for protein analysis and compared to baseline. In addition to the hypoxia treatment, cells were also treated in parallel with TGF- β 1 and TGF- β 2 to determine if combination of hypoxia and TGF- β affects EndMT in a similar manner as each treatment alone.

2.4. Evaluation of EndMT Induction

Induction of EndMT was assessed by Western Blot Analysis. Cell lysates were prepared in RIPA buffer. Protein concentration was estimated using Bradford Assay (Bio-Rad). SDS-PAGE and Western blots were performed according to standard procedures²⁴ using primary antibodies against CD31 (Cell Signaling Technology, #3528), α -SMA (Sigma, #A2547), SM22- α (Abcam, #ab14106), calponin (Abcam, #ab46794), and α -tubulin (SC-58666, Santa Cruz Biotechnology). Chemiluminescent signal was detected using the ChemiDoc™ XRS System (Bio-Rad Laboratories), and densitometry analysis performed using Quantity One software (Bio-Rad).

2.5. Statistical Analysis

Data obtained from all experiments were analyzed for significance using One-Way ANOVA with Sigma-Plot and GraphPad Prism Software, followed by Holm-Sidak or Newman-Keuls multiple comparison post-tests. When applicable, ANOVA *on Ranks* was performed. Experiments were repeated 3 times for HCAECs and 4 times for HMPAECs. Differences between means were considered significant when $p \leq 0.05$. All data are presented as means \pm standard error.

3. Results

3.1. Effect of Culture Time on the Expression of Smooth Muscle Markers in Endothelial Cells

The expression of smooth muscle markers was determined in commercially available human coronary artery (HCAECs) and microvascular pulmonary (HMPAECs) endothelial cells cultured for 5 days without media change. Western blot analysis showed that cultures of both cell types expressed detectable levels of the smooth muscle markers α -SMA and SM22- α 48 hours after plating. HMPAECs also expressed calponin, another smooth muscle marker, which was not significantly expressed in cultures of HCAECs (Figure 1A). After 5 days in culture, HMPAECs showed a strong trend towards increase in the expression of α -SMA, SM22- α and calponin by 1.98 ± 0.32 , 1.69 ± 0.30 and 3.88 ± 1.25 -fold, respectively, relative to baseline levels (2 days after plating). In HCAECs this increase was less pronounced for SM22- α (1.43 ± 0.31 -fold) and calponin (1.95-fold), or slightly reduced in the case of α -SMA (0.81 ± 0.06 -fold) (Figure 1A and 1B). Interestingly, the expression of the endothelial marker CD31 was increased in HCAECs by 2.94 ± 1.03 -fold while remained unchanged in

HMPAECs (Figure 1A and 1B). We did not observe any morphological changes typical of EndMT in HMPAECs and HCAECs after 5 days in culture relative to baseline. However, we noticed that, compared to HCAECs, HMPAECs were larger and had a more elongated morphology with visible cytosolic filamentous structures in some cells (Figure 1C).

3.2. Effect of TGF- β on the Expression of Smooth Muscle Markers in Endothelial Cells

The involvement of TGF- β in EndMT has been widely described in the literature¹²⁻¹⁵. Nevertheless, a standard detailed protocol for its application as a potent inducer of EndMT *in vitro* has not been established. We tested the effect of different doses of TGF- β 1 and TGF- β 2 on the expression of smooth muscle markers in HMPAECs and HCAECs. We found that treatment of HCAECs with both TGF- β 1 and TGF- β 2 induced the expression of α -SMA and SM22- α (Figure 2). Although all doses of TGF- β 1 and TGF- β 2 tested induced α -SMA expression, the one with highest effect was 5ng/ml, which caused 3.23 ± 0.35 and 2.54 ± 0.32 -fold increase, respectively. Our results also show that induction by TGF- β 1 was $29.92 \pm 17.5\%$ higher than TGF- β 2. However, this finding was not statistically significant. The expression of SM22- α was increased in HCAECs with all doses of TGF- β 1 and TGF- β 2 tested in a trend similar to α -SMA, though reaching higher fold changes at lower doses (3.97 ± 1.82 vs 2.43 ± 0.19 for 2ng/ml TGF- β 1, and 3.62 ± 0.76 vs 1.87 ± 0.16 for 2ng/ml TGF- β 2). The expression of endothelial markers is expected to decrease during transition. However, despite induction of smooth muscle markers in HCAECs with both types of TGF- β , only with 5ng/ml TGF- β 2 we observed a decrease in the expression of the endothelial marker CD31 to 0.59 ± 0.21 -fold, although this decrease was not statistically significant. In HMPAECs only TGF- β 1 showed a significant effect on the induction of α -SMA expression, different from what we observed in HCAECs in which both types of TGF- β had an effect (Figure 3). From the three TGF- β 1 doses tested, 5ng/ml and 10ng/ml were the most effective, increasing α -SMA expression by 1.94 ± 0.29 and 1.77 ± 0.17 -fold relative to untreated control, respectively. Interestingly, no significant changes were detected in the expression of SM22- α , like we observed in HCAECs. Furthermore, the degree of α -SMA induction in HCAECs was higher than in HMPAECs, 3.23 ± 0.35 vs. 1.94 ± 0.29 after treatment with 5ng/ml TGF- β 1. Microscopic analysis of HCAECs and HMPAECs after treatment with TGF- β 1 and TGF- β 2 showed morphological changes characterized by an increase in cell size relative to untreated cells, associated with evidence of filamentous structures in the cytosol, which was more evident in HMPAECs (Figure 4).

3.3. Effect of Hypoxia on the Expression of Smooth Muscle Markers in Endothelial Cells

Hypoxia has been known as an important inducer of tissue fibrosis in different pathological processes^{23, 25-27}, and its involvement in EndMT has been reported²³. We tested the effect of 1% hypoxia alone or in combination with TGF- β on the induction of smooth muscle markers relative to baseline (2 days after plating) and normoxia control (5 days later) in HCAECs and HMPAECs. Culture time had an impact on the expression of smooth muscle markers in both HCAECs and HMPAECs as we initially demonstrated (Figure 1). In HCAECs, hypoxia exposure for 5 days caused a further decrease in the expression of α -SMA relative to control cells under normoxia from 0.81 ± 0.06 - down to 0.47 ± 0.10 -fold. Interestingly, the opposite was observed for SM22- α , which expression was significantly induced in HCAECs, relative to baseline, from 1.43 ± 0.31 -fold in normoxia control to 11.41 ± 4.89 in hypoxia (Figure 5A and B). When comparing both cell types, inverse changes were observed in the expression of α -SMA, and while it decreased in HCAECs, in HMPAECs it was increased up to 1.98 ± 0.32 -fold (Figure 6A and B). Though the expression of SM22- α was increased in both cell types, this effect was significant only after exposure of HCAECs to hypoxia (Figure 5A and B). In HMPAECs, SM22- α induction was mild compared to HCAECs, and about the same under normoxia and hypoxia relative to baseline. These results indicate that in HMPAECs, the induction of smooth muscle markers relative to baseline is independent of the oxygen levels and the marker tested, but related to the length of time in culture (Figure 6A and B). Although the expression of α -SMA and SM22- α in HCAECs was induced by both TGF- β 1 and TGF- β 2 under normoxia, only TGF- β 1 induced a significant increase in the expression of α -SMA under hypoxia of 1.75 ± 0.31 -fold (Figure 5C). No effect on the expression of SM22- α was observed. Similar results were found in HMPAECs, except that in this cell type, TGF- β 2, but not TGF- β 1, showed a strong trend towards increase in the expression of α -SMA at all doses tested (Figure 6C). The endothelial marker CD31 was induced in both cell types under hypoxia, probably due to hypoxia-induced inflammatory response (Figures 5 and 6).

4. Discussion

The involvement and potential targeting of EndMT in fibrotic conditions has increased the research demand in the field. Most studies have pursued the use of TGF- β as the main tool for induction of EndMT based on its well-known contribution to endocardial cushion formation during development and fibrotic diseases^{1, 28}. However, the lack of a detailed protocol that could be reproduced by the research community, the general assumption that all members of the TGF- β

family play similar roles on the induction of EndMT, and that all endothelial cells respond to extracellular signals the same way is not realistic. In the present study, we investigated the effect of two members of the TGF- β family on the induction of EndMT using two different types of human adult endothelial cells. In addition, we tested the effect of hypoxia on the induction of EndMT, as ischemia is an important trigger of tissue fibrosis²⁹.

One of the first problems we encountered when starting our studies on EndMT was the lack of detailed and consistent information regarding the culture conditions, concentration and duration of TGF- β treatment. In addition, TGF- β treatment ranged in general from 2 to 10 days in serum-free conditions or media supplemented with serum^{9, 12, 13, 30, 31}. Importantly, it was not clear if the culture media was replaced along treatment or if TGF- β was added without media change. These are relevant information to be provided as serum-free conditions may induce massive endothelial cell death as early as 24 hours (personal unpublished observations), and different pathways would be stimulated by culture media change, especially if serum-supplemented. Based on these considerations, we designed a protocol consisting of 5 days TGF- β treatment, without culture media change, and followed the expression of endothelial and smooth muscle markers in commercially available HMPAECs and HCAECs at the end of 5 days. Our results indicate that, independent of TGF- β addition, both cell types express smooth muscle markers in addition to the endothelial marker CD31 since initial plating. Coexpression of smooth muscle markers in endothelial cells has been previously described^{14, 31-33}. Freshly purified bovine adult arterial endothelial cells showed spontaneous and progressive increase in the expression of smooth muscle markers with time in culture, triggered shortly after cell isolation³². Interestingly, we found that the expression of smooth muscle markers increased with time in HMPAECs, but remained relatively constant in HCAECs, suggesting that HMPAECs are more susceptible to spontaneous EndMT. Frid et al demonstrated that this spontaneous process of EndMT appears to be mediated by TGF- β 1, as blocking antibodies against this cytokine reduced the number of cells expressing smooth muscle proteins in a dose-dependent fashion³². In addition, they have shown that growing endothelial cells on collagen-coated dishes reduced spontaneous EndMT³². However, in our hands, growth of HMPAECs on collagen-coated dishes since first thawing was not enough to prevent spontaneous EndMT, suggesting that the effect of collagen may be cell-specific. In further support of our findings, Paranya et al showed that certain clones of endothelial cells undergo EndMT independent of TGF- β treatment, when grown under low-serum conditions²⁹. We can speculate that in our case, by not changing the culture media for a period of 5 days, nutrients are depleted, mimicking low-serum condition.

Several studies support the role of members of the TGF- β family of growth factors, especially TGF- β 1 and TGF- β 2, in EndMT^{12, 13, 15, 32, 34}. Although different TGF- β isoforms have been reported to induce EndMT with similar potential^{12, 29, 35}, this may not be true for all endothelial cell types. Our results suggest that the effect of TGF- β on the induction of smooth muscle markers is isoform- and endothelial cell type-dependent. Similar to what we found, isoform-dependent results have also been reported in human pulmonary valve endothelial cells, in which only TGF- β 2 caused significant increase in the expression of smooth muscle markers relative to TGF- β 1 and TGF- β 3³¹. One of the possible explanations for the differences among our study and others may be due to the endothelial cell source used, which range from embryonic-derived to adult and from animal to human endothelial cells. Endothelial cells from different vascular beds have a distinct genetic profile and specific roles that are intrinsic to their hosting tissue¹⁶, therefore they may not respond similarly to the same treatment. Although embryonic and adult valve endothelial cells undergo TNF- α dependent EndMT, activation of TGF- β signaling was found only in the embryonic endothelium¹⁴. In another example, TGF- β 2 induced EndMT in human pulmonary valve endothelial cells in a clone-dependent fashion, while human dermal endothelial cells failed to respond to different TGF- β isoforms and undergo EndMT³¹. The dose of TGF- β used to induce EndMT may also account for the differences found in research studies. When reviewing the literature we found a wide range in doses of different TGF- β isoforms tested, with many studies tending to the use the high dose of 10ng/ml. In addition, when TGF- β isoforms have been tested together, the same dose has been used for the different isoforms, assuming that they would act in a similar fashion, compared to when tested alone. This generates concern, especially in the case of TGF- β , which has been reported to trigger different, sometimes opposite, effects depending on the dose used¹⁸. Our results show that small doses of both TGF- β 1 and TGF- β 2 are not only sufficient, but more effective than high doses to induce the expression of smooth muscle markers in HCAECs. The same trend was observed in HMPAECs, but to less extent, probably because the basal levels of these markers in these cells is already high. These findings are supported by reports showing that low concentrations ranging from 0.25-2ng/ml were sufficient to induce EndMT^{31, 32, 35}.

One important feature of EndMT is loss of the endothelial phenotype, characterized by decreased expression of cell surface molecules. Interestingly, in our study, we were not able to see a robust decrease in the expression of the endothelial marker CD31, as previously reported. In fact, we saw a high degree of variability in the expression of CD31, with a tendency towards decrease depending on the cell type, TGF- β isotype and dose. In agreement

with our findings, TGF- β caused a slight decrease in the expression of CD31 in pancreatic microvascular cells⁸. Similar observations have been reported in aortic valve endothelial cells, which retained CD31 expression after TGF- β 1 treatment²⁹. Changes in the expression of endothelial markers may not occur all at once and may also be specific to individual markers. Kokudo et al reported that although TGF- β 2 treatment caused a decrease in the expression of claudin-5, the expression of VE-cadherin was unaffected, suggesting a marker-specific effect¹². Similarly, immunofluorescence analysis showed that in pancreatic microvascular endothelial cells, reduction of VE-cadherin expression by TGF- β 2 was restricted to some cells³⁵. It is possible that our findings indicate an intermediate phenotype of EndMT, which has partially undergone transition³⁶. In fact, loss of the endothelial phenotype during transition has been proposed to occur after completion of EndMT⁸.

Hypoxia has been shown to be a potent inducer of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in fibrotic disease^{20, 37} and cancer³⁸, through mechanisms that may involve activation of TGF- β signaling^{20, 21}. More recently, the contribution of hypoxia to EndMT has also been demonstrated^{19, 23, 39, 40}. In the present study we show different results regarding the expression of smooth muscle markers after exposure to hypoxia, which was dependent on the endothelial cell type. The expression of α -SMA and SM22- α in HMPAECs was induced to the same extent under normoxia or hypoxia conditions relative to baseline, suggesting that hypoxia had no effect in these cells, and that the increase in the expression of these proteins was related to the length of time they were maintained in culture. Interestingly, in HCAECs exposed to hypoxia, we found that α -SMA expression was decreased, while SM22- α was increased, relative to baseline and normoxia control. The reason for these inverse findings on the expression of smooth muscle markers in HCAECs is not clear. It is possible that each one of these proteins exert specific functions related or not to EndMT, as hypoxia is known to trigger other cellular effects such as senescence and inflammation. Regarding the expression of α -SMA, our results in HCAECs differ from recently published findings indicating a significant increase in the expression of this marker after exposure to hypoxia²³. The differences in the design of both studies make it difficult to explain these divergent results and reach proper conclusions. Xu et al determined the expression of smooth muscle markers in purified cell populations that were negative for CD31, while in our study sorting was not performed, and we analyzed the entire cell population. In addition, we found an increase in the expression of CD31 over time and after hypoxia exposure. It is possible that only specific subpopulations of endothelial cells undergo EndMT³², which can be enriched by sorting, or

missed in whole cell population analysis like in our study. Interestingly, we also found specific effects of TGF- β isoforms that are dependent on the cell type under hypoxia. TGF- β has been shown to trigger opposite effects dependent on the dose used, and to activate different types of receptors, triggering diverse downstream pathways in a context-dependent way^{17, 18}. Future studies to clarify the role of TGF- β signaling in both EndMT and EMT will be essential for potential targeting of these pathways in fibrotic diseases and cancer. Our work suggests that special attention is needed to the current design of EndMT studies, and that optimization of induction conditions is essential, as pathways triggering EndMT may vary during development and different pathological conditions.

Funding

This work was supported by discretionary funds from the Interdisciplinary Stem Cell Institute, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL, to Claudia O. Rodrigues. M.T.P. was a fellow of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), fellowship number 2011/21740-7.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Keith Webster for critical reading of this manuscript.

Conflict of Interest

None.

References

1. Lin F, Wang N, Zhang TC. The role of endothelial-mesenchymal transition in development and pathological process. *IUBMB Life* 2012;**64**:717-723.
2. Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Molecular mechanisms of endothelial to mesenchymal cell transition (EndoMT) in experimentally induced fibrotic diseases. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012;**5**:S7.
3. Markwald RR, Fitzharris TP, Manasek FJ. Structural development of endocardial cushions. *Am J Anat* 1977;**148**:85-119.
4. He J, Xu Y, Koya D, Kanasaki K. Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2013;**17**:488-497.
5. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 2008;**19**:2282-2287.
6. Ghosh AK, Nagpal V, Covington JW, Michaels MA, Vaughan DE. Molecular basis of cardiac endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT): differential expression of microRNAs during EndMT. *Cell Signal* 2012;**24**:1031-1036.
7. Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;**293**:L1-8.
8. Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, Kawabe T, Shimokata K, Hasegawa Y. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010;**43**:161-172.
9. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007;**13**:952-961.
10. Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* 2008;**99**:1375-1379.
11. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 2007;**67**:10123-10128.
12. Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, Miyazono K. Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Sci* 2008;**121**:3317-3324.
13. Medici D, Potenta S, Kalluri R. Transforming growth factor-beta2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling. *Biochem J* 2011;**437**:515-520.
14. Mahler GJ, Farrar EJ, Butcher JT. Inflammatory cytokines promote mesenchymal transformation in embryonic and adult valve endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;**33**:121-130.
15. Arciniegas E, Sutton AB, Allen TD, Schor AM. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci* 1992;**103** (Pt 2):521-529.
16. Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, Jahnsen FL, Troyanskaya OG, Chang DS, Wang Z, Rockson SG, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:10623-10628.

17. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J* 2002;**21**:1743-1753.
18. Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol* 2010;**20**:556-567.
19. Bijkerk R, de Bruin RG, van Solingen C, Duijs JM, Kobayashi K, van der Veer EP, ten Dijke P, Rabelink TJ, Goumans MJ, van Zonneveld AJ. MicroRNA-155 functions as a negative regulator of RhoA signaling in TGF-beta-induced endothelial to mesenchymal transition. *Microna* 2012;**1**:2-10.
20. Copple BL, Bustamante JJ, Welch TP, Kim ND, Moon JO. Hypoxia-inducible factor-dependent production of profibrotic mediators by hypoxic hepatocytes. *Liver Int* 2009;**29**:1010-1021.
21. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal* 2014;**7**:re8.
22. Goumans MJ, van Zonneveld AJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a switch to cardiac fibrosis? *Trends Cardiovasc Med* 2008;**18**:293-298.
23. Xu X, Tan X, Tampe B, Sanchez E, Zeisberg M, Zeisberg EM. Snail Is a Direct Target of Hypoxia-inducible Factor 1alpha (HIF1alpha) in Hypoxia-induced Endothelial to Mesenchymal Transition of Human Coronary Endothelial Cells. *J Biol Chem* 2015;**290**:16653-16664.
24. Florea V, Bhagavatula N, Simovic G, Macedo FY, Fock RA, Rodrigues CO. c-Myc is essential to prevent endothelial pro-inflammatory senescent phenotype. *PLoS One* 2013;**8**:e73146.
25. Kawakami T, Mimura I, Shoji K, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia and fibrosis in chronic kidney disease: crossing at pericytes. *Kidney Int Suppl (2011)* 2014;**4**:107-112.
26. Manresa MC, Godson C, Taylor CT. Hypoxia-sensitive pathways in inflammation-driven fibrosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014;**307**:R1369-1380.
27. Ruthenborg RJ, Ban JJ, Wazir A, Takeda N, Kim JW. Regulation of wound healing and fibrosis by hypoxia and hypoxia-inducible factor-1. *Mol Cells* 2014;**37**:637-643.
28. Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol* 2011;**179**:1074-1080.
29. Paranya G, Vineberg S, Dvorin E, Kaushal S, Roth SJ, Rabkin E, Schoen FJ, Bischoff J. Aortic valve endothelial cells undergo transforming growth factor-beta-mediated and non-transforming growth factor-beta-mediated transdifferentiation in vitro. *Am J Pathol* 2001;**159**:1335-1343.
30. Diez M, Musri MM, Ferrer E, Barbera JA, Peinado VI. Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGFbetaRI. *Cardiovasc Res* 2010;**88**:502-511.
31. Paruchuri S, Yang JH, Aikawa E, Melero-Martin JM, Khan ZA, Loukogeorgakis S, Schoen FJ, Bischoff J. Human pulmonary valve progenitor cells exhibit endothelial/mesenchymal plasticity in response to vascular endothelial growth factor-A and transforming growth factor-beta2. *Circ Res* 2006;**99**:861-869.
32. Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ Res* 2002;**90**:1189-1196.
33. Beranek JT. Vascular endothelium-derived cells containing smooth muscle actin are present in restenosis. *Lab Invest* 1995;**72**:771.

34. Ishisaki A, Hayashi H, Li AJ, Imamura T. Human umbilical vein endothelium-derived cells retain potential to differentiate into smooth muscle-like cells. *J Biol Chem* 2003;**278**:1303-1309.
35. Mihira H, Suzuki HI, Akatsu Y, Yoshimatsu Y, Igarashi T, Miyazono K, Watabe T. TGF-beta-induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A. *J Biochem* 2012;**151**:145-156.
36. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;**119**:1420-1428.
37. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M, Haase VH. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2007;**117**:3810-3820.
38. Shaikh D, Zhou Q, Chen T, Ibe JC, Raj JU, Zhou G. cAMP-dependent protein kinase is essential for hypoxia-mediated epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion in lung cancer cells. *Cell Signal* 2012;**24**:2396-2406.
39. Choi SH, Hong ZY, Nam JK, Lee HJ, Jang J, Yoo RJ, Lee YJ, Lee CY, Kim KH, Park S, Ji YH, Lee YS, Cho J, Lee YJ. A Hypoxia-Induced Vascular Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. *Clin Cancer Res* 2015.
40. Lee SW, Won JY, Kim WJ, Lee J, Kim KH, Youn SW, Kim JY, Lee EJ, Kim YJ, Kim KW, Kim HS. Snail as a potential target molecule in cardiac fibrosis: paracrine action of endothelial cells on fibroblasts through snail and CTGF axis. *Mol Ther* 2013;**21**:1767-1777.

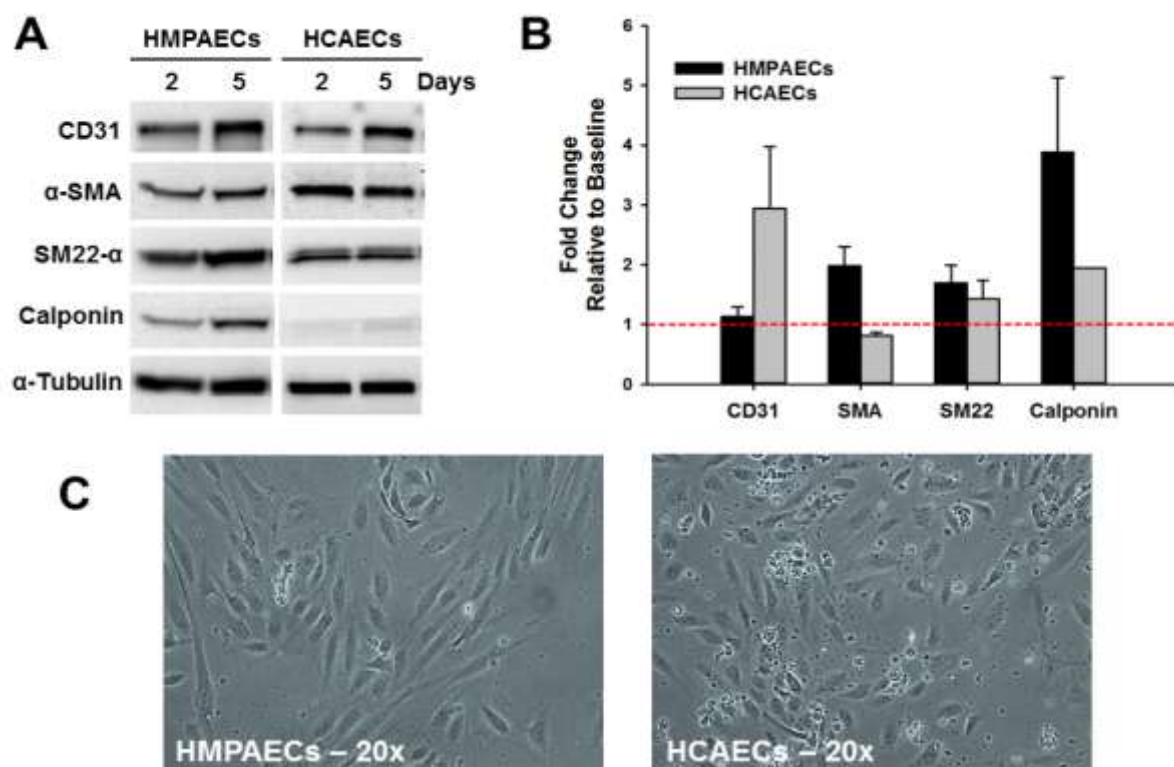


Figure 1. Time-dependent Change in the Expression of Endothelial and Smooth Muscle Markers in HMPAECs and HCAECs. **A.** Representative Western blot image comparing changes in the expression of the endothelial marker CD31 and the smooth muscle markers α -SMA, SM22- α and calponin in HMPAECs and HCAECs with time in culture. **B.** Quantification of endothelial and smooth muscle markers expression by densitometry analysis of western blots. **C.** Morphology of HMPAECs and HCAECs after 5 days in culture (Magnification 20X). Results were normalized to α -tubulin (loading control) and expressed as fold-change relative to baseline (day 5 versus day 2 after plating). CD31 (HMPAECs, n = 4; HCAECs, n = 3); α -SMA (n = 3), SM22- α (n = 3), calponin (HMPAECs, n = 3; HCAECs, n = 2).

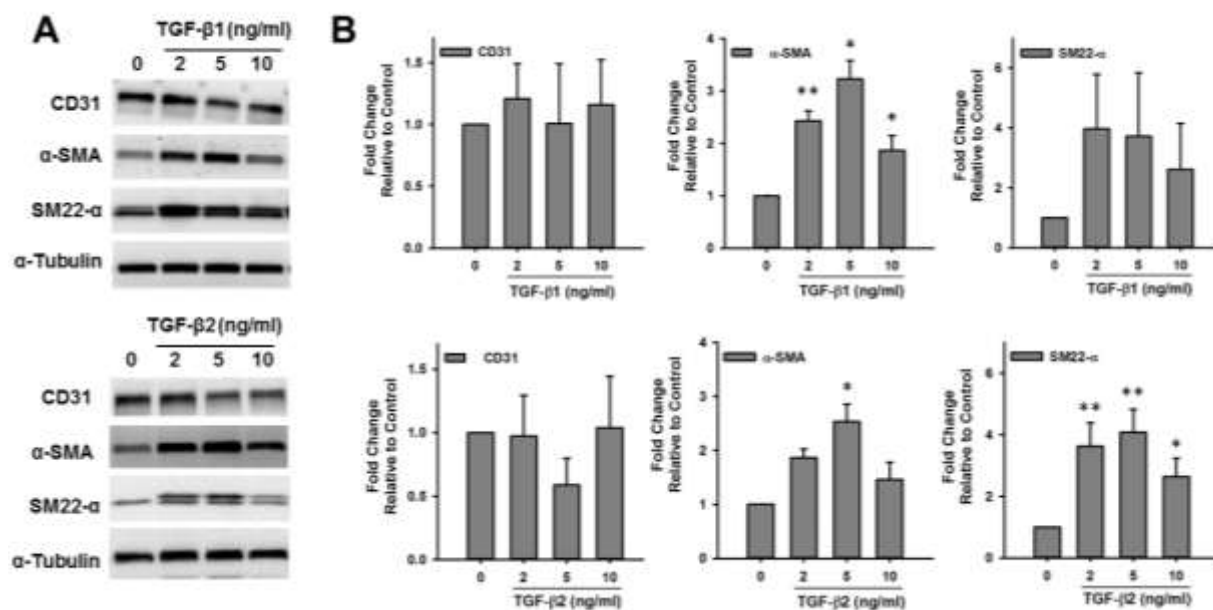


Figure 2. Effect of TGF- β on the Expression of Endothelial and Smooth Muscle Markers in HCAECs. **A.** Representative Western blot images comparing changes in the expression of the endothelial marker CD31 and the smooth muscle markers α -SMA and SM22- α in HCAECs after exposure to different doses of TGF- β 1 and TGF- β 2. **B.** Quantification of endothelial and smooth muscle markers expression by densitometry analysis of western blots. Results were normalized to α -tubulin (loading control) and expressed as fold-change relative to control without TGF- β . (n = 3, *p<0.05, **p<0.005).

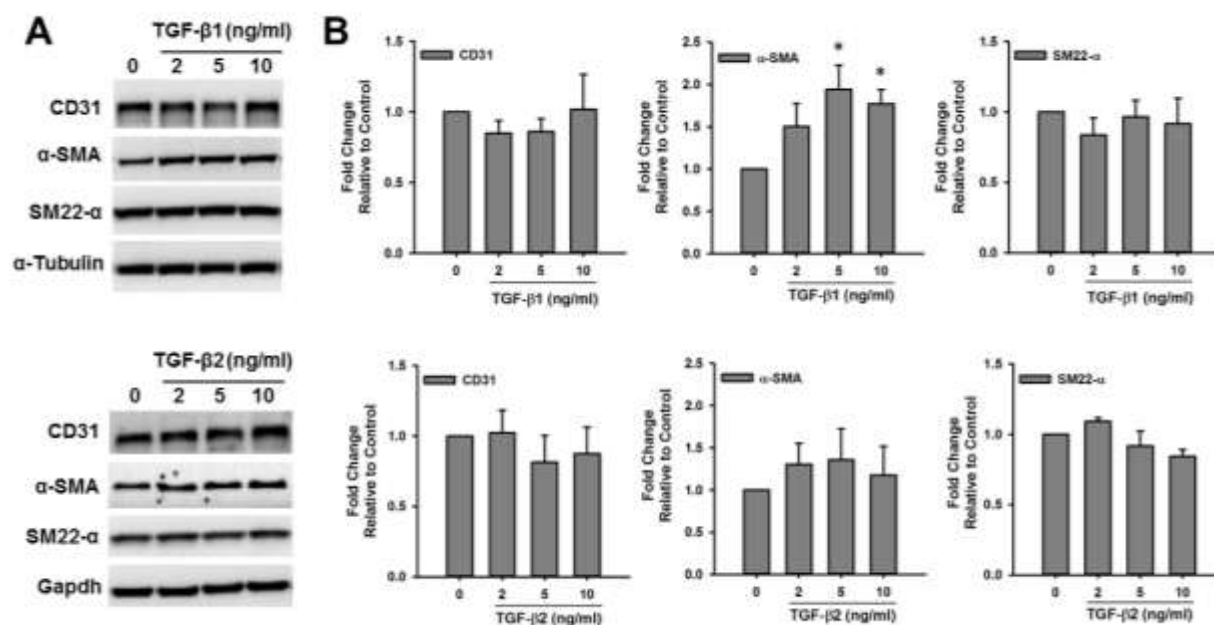


Figure 3. Effect of TGF- β on the Expression of Endothelial and Smooth Muscle Markers in HMPAECs. **A.** Representative Western blot images comparing changes in the expression of the endothelial marker CD31 and the smooth muscle markers α -SMA and SM22- α in HMPAECs after exposure to different doses of TGF- β 1 and TGF- β 2. **B.** Quantification of endothelial and smooth muscle markers expression by densitometry analysis of western blots. Results were normalized to α -tubulin (loading control) and expressed as fold-change relative to control without TGF- β . (n = 3-4, *p<0.05).

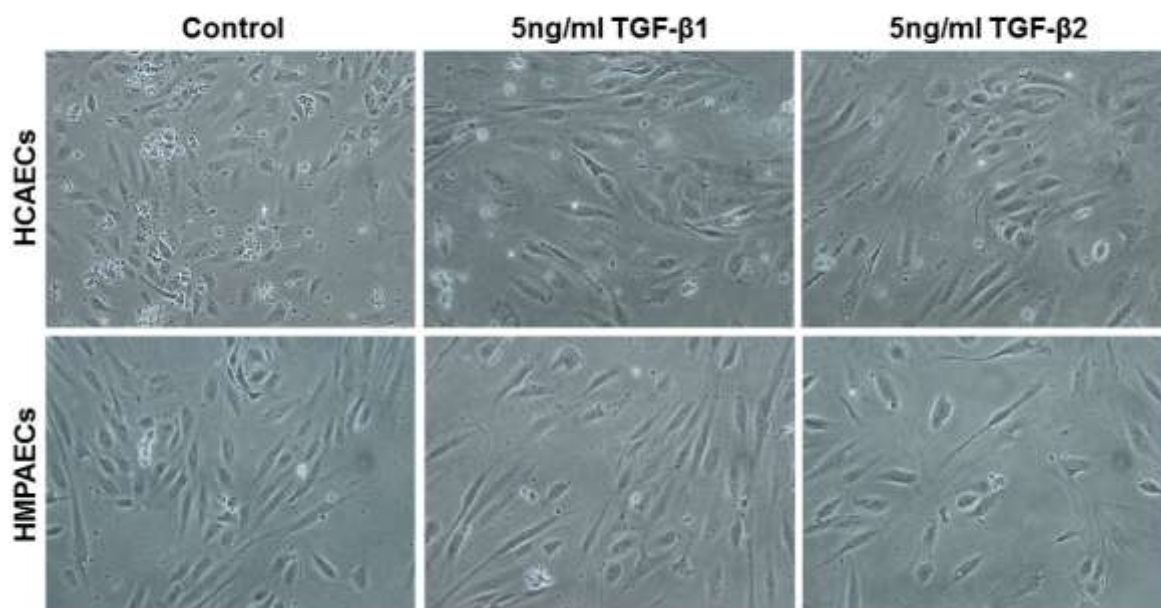


Figure 4. Morphological changes in HCAECs and HMPAECs after exposure to TGF- β . Representative images of HCAECs and HMPAECs before and after exposure to 5ng/ml TGF- β 1 and TGF- β 2 for a total period of 5 days compared to control without TGF- β (Magnification = 20X).

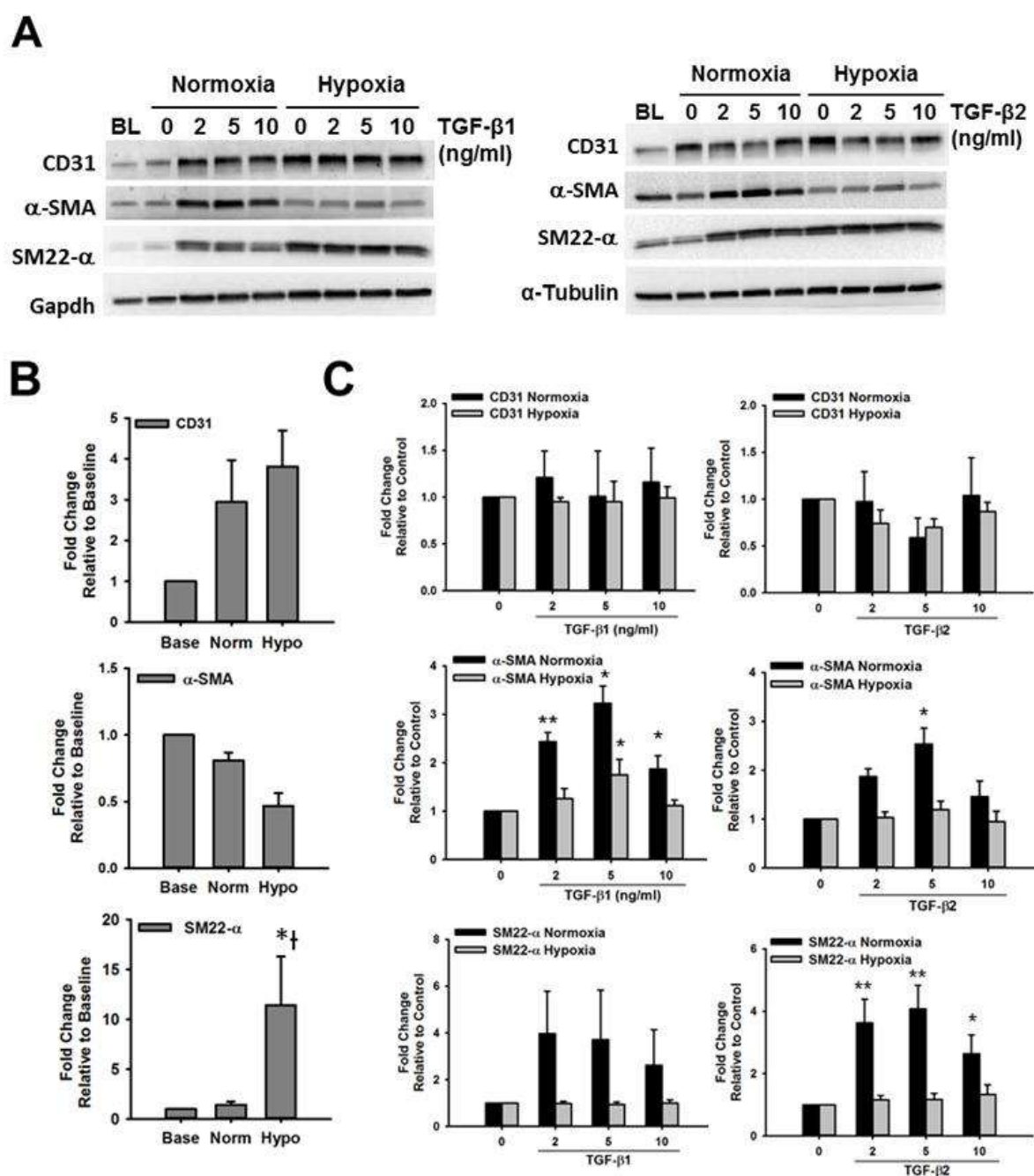


Figure 5. Effect of Hypoxia and TGF- β on the Expression of Endothelial and Smooth Muscle Markers in HCAECs. **A.** Representative Western blot images comparing changes in the expression of the endothelial marker CD31 and the smooth muscle markers α -SMA and SM22- α in HCAECs after exposure to different doses of TGF- β 1 and TGF- β 2 under Normoxia (21% O₂) and Hypoxia (1% O₂). **B and C.** Quantification of endothelial and smooth muscle markers expression by densitometry analysis of western blots. Results were normalized to α -tubulin (loading control) and expressed as fold-change relative to baseline (BL) in B, and relative to control without TGF- β in C. (n = 3, *p<0.05, **p<0.005).

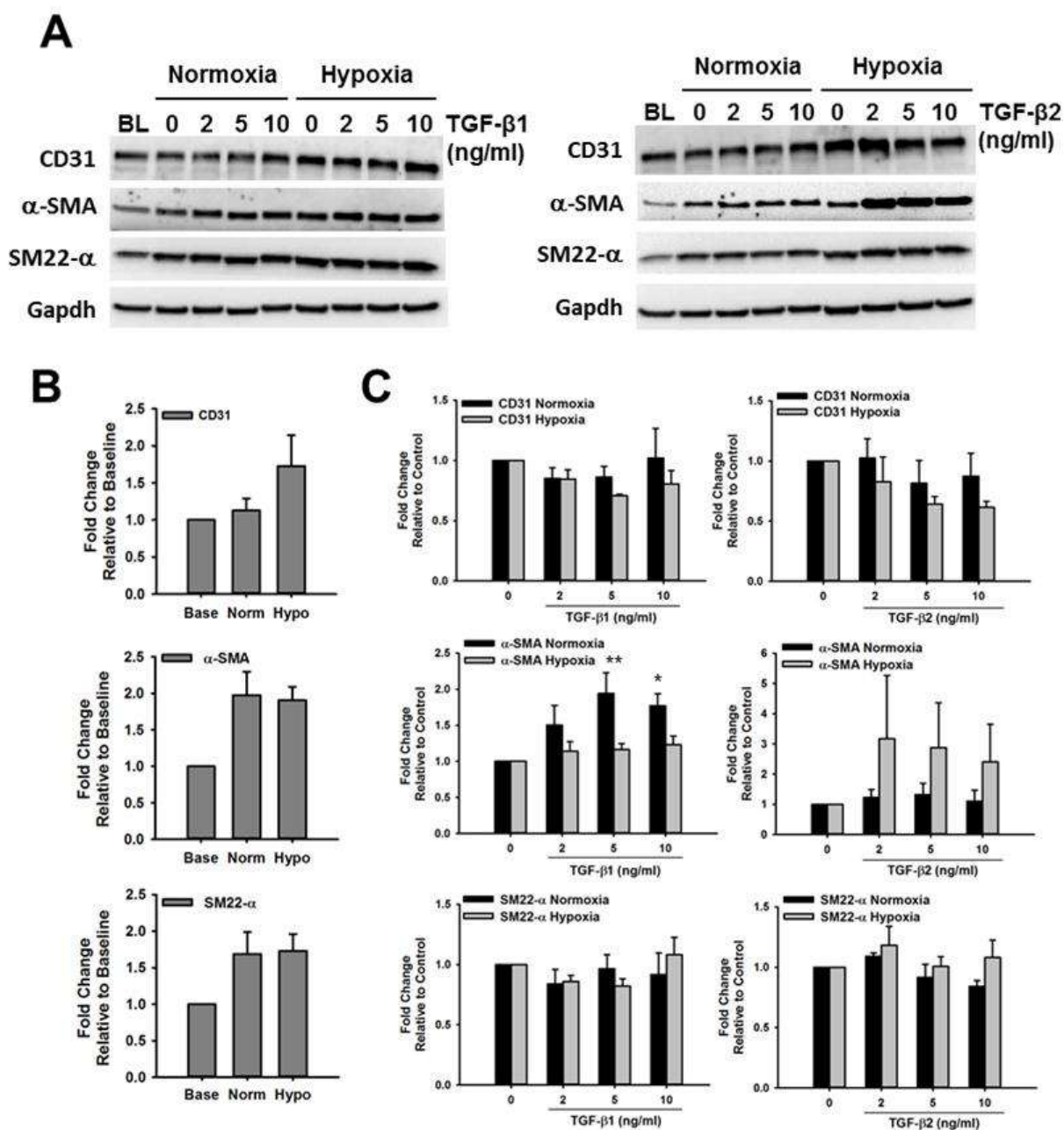


Figure 6. Effect of TGF- β on the Expression of Endothelial and Smooth Muscle Markers in HMPAECs. **A.** Representative Western blot images comparing changes in the expression of the endothelial marker CD31 and the smooth muscle markers α -SMA and SM22- α in HMPAECs after exposure to different doses of TGF- β 1 and TGF- β 2 under Normoxia (21% O₂) and Hypoxia (1% O₂). **B and C.** Quantification of endothelial and smooth muscle markers expression by densitometry analysis of western blots. Results were normalized to α -tubulin (loading control) and expressed as fold-change relative to baseline (BL) in B, and relative to control without TGF- β in C. (n = 3-4, *p<0.05).