

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

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.

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*).

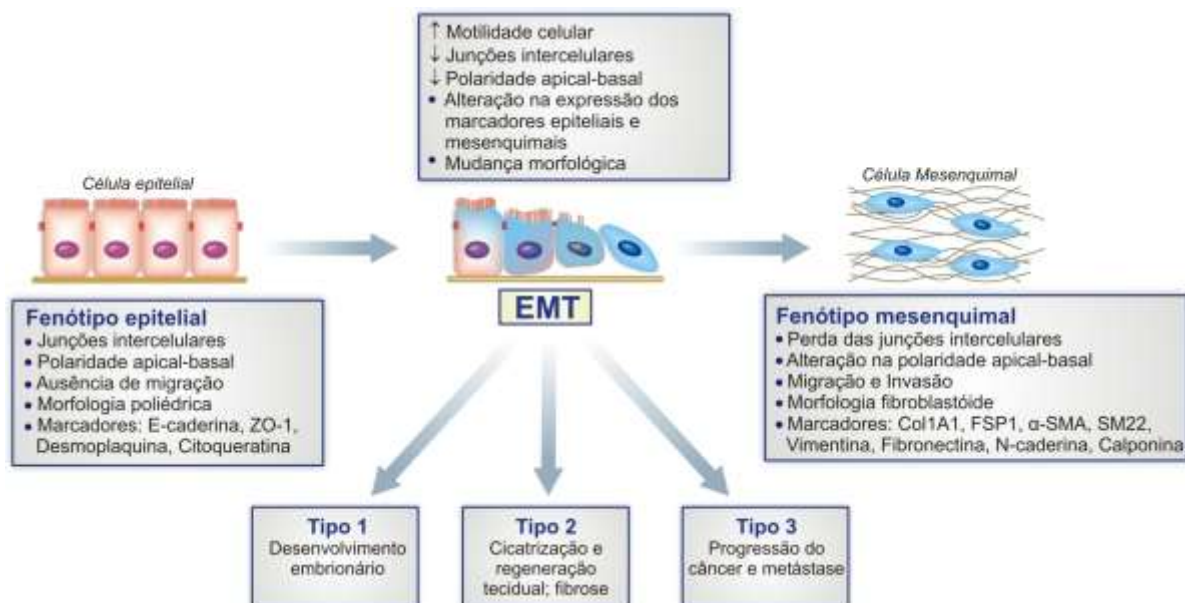


Figura 1. Esquema das alterações celulares durante o processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT). No início da EMT, as células epiteliais apresentam junções celulares, polaridade apical-basal, morfologia poliédrica, não possuem capacidade migratória e expressam os marcadores E-caderina, desmoplaquina, 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)

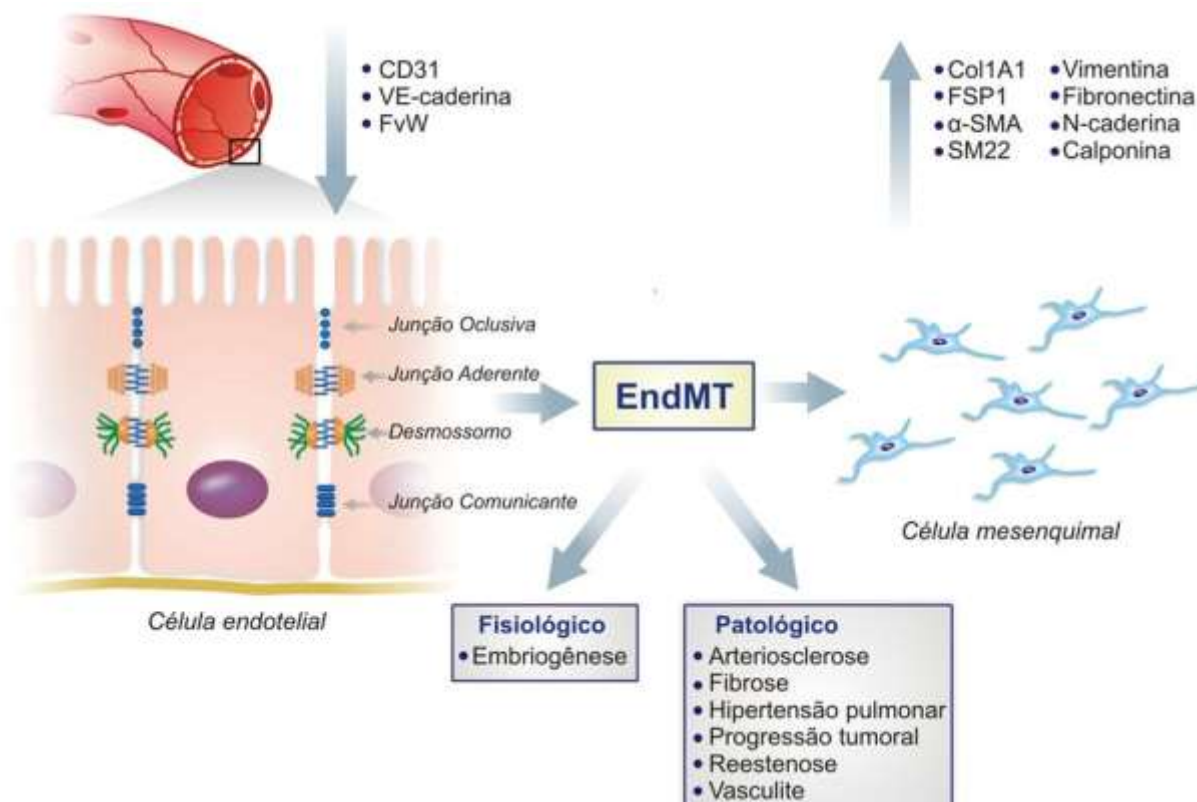


Figura 2. Modelo esquemático da transição endotélio-mesenquimal (EndMT). O programa da EndMT é caracterizado pela diminuição da expressão dos marcadores endoteliais CD31, VE-caderina e Fator de vonWillebrand (FvW) e aumento da expressão dos marcadores mesenquimais Col1A1, FSP1, α -SMA, SM22, vimentina, 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 (DII1, DII3, DII4) 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).

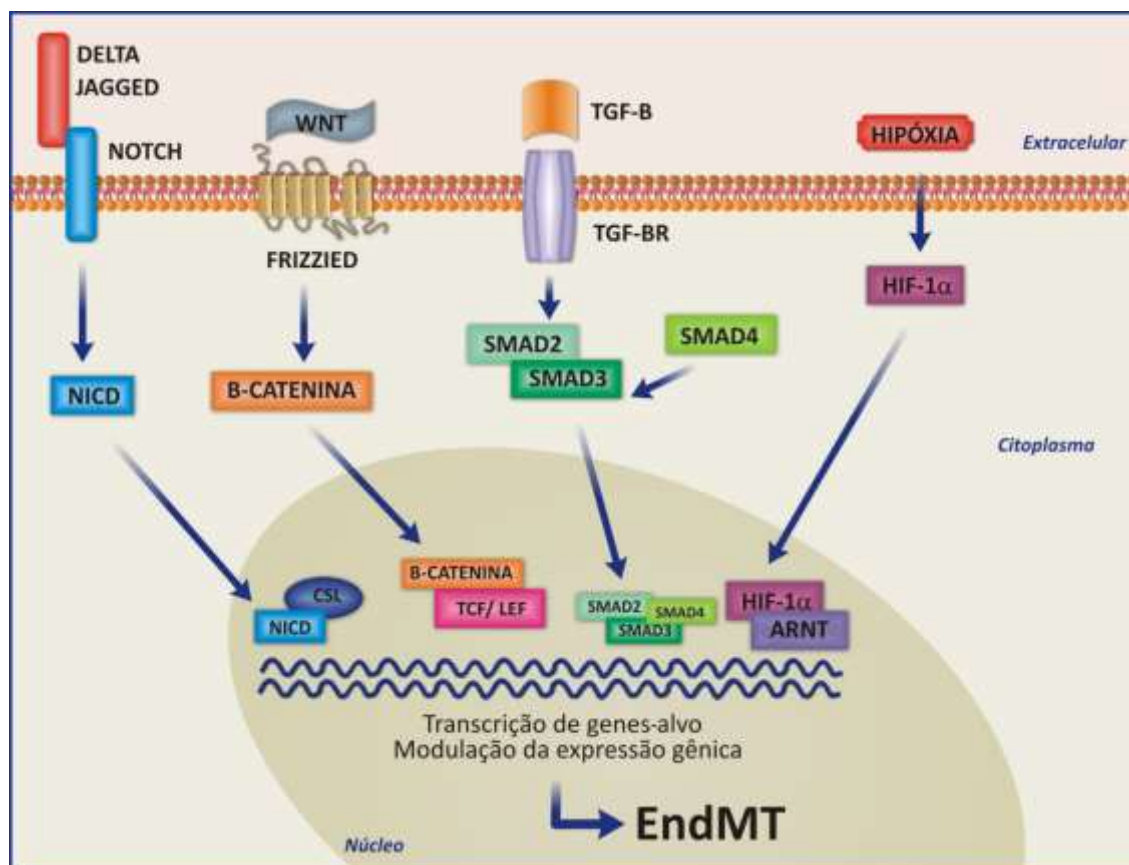


Figura 3. Mecanismos moleculares envolvidos no processo de EndMT. A ativação da via Notch, Wnt, TGF- β e o processo de hipóxia ocasionam a ativação de fatores de transcrição que resultam na transcrição de genes-alvo e consequentemente modulam a expressão gênica.

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.

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.

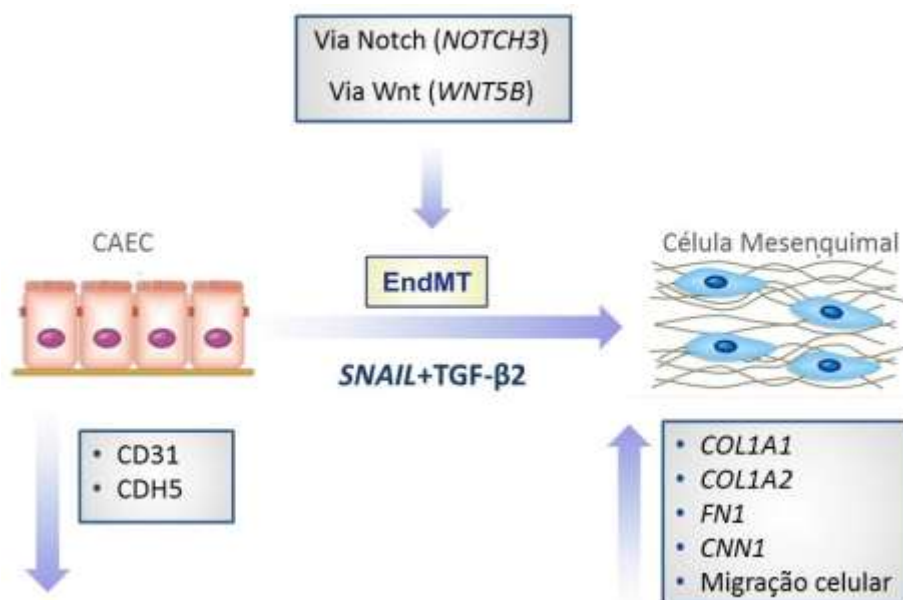


Figura 25. Esquema das alterações celulares obtidas no presente estudo durante o processo de transição endotélio-mesenquimal (EndMT). A linhagem de célula endotelial da artéria coronária (CAEC) foi induzida pela superexpressão do fator de transcrição *SNAIL* associado ao tratamento com TGF- β 2 (*SNAIL*+TGF- 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 β /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 BMP2 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.