

CURSO DE FARMÁCIA

Maribel Josimara Bresciani

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DA TRANSIÇÃO EPITELIAL-
MESENQUIMAL NO CÂNCER DE PULMÃO**

Santa Cruz do Sul
2016

Maribel Josimara Bresciani

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DA TRANSIÇÃO EPITELIAL-
MESENQUIMAL NO CÂNCER DE PULMÃO**

Projeto de pesquisa a ser apresentado à disciplina de Trabalho de Curso II, do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul para obtenção do título de farmacêutica.

Orientadora: Prof^a Dra. Lia Gonçalves Possuelo

Coorientadora: Prof^a Dra. Karina Mariante Monteiro

Santa Cruz do Sul
2016

AGRADECIMENTOS

Durante toda minha vida, acompanhei meus irmãos saindo do conforto do lar para cursar uma graduação, um a um, todos saindo do interior de Venâncio Aires, de um lugar que não tinha sinal de internet e muito menos de celular. Aliás, até hoje continua assim. Sempre vi neles uma inspiração. E com o tempo restou eu, a bebê da casa.

Acho que no dia em que eu finalmente decidi o caminho que eu queria seguir na minha vida, no dia que falei aos meus pais a vontade de ser farmacêutica eu vi um olhar de tristeza nos olhos deles e sabia que não era pela decisão da futura profissão, mas por finalmente cair a ficha de que todos os filhos saíam de casa, por ser só os dois morando sozinhos novamente, como era antes de nós 4 chegarmos.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer as pessoas mais importantes na minha vida, meus pais, Odair e Nair. Sempre me apoiaram incondicionalmente para eu chegar até aqui. Vocês são meus exemplos de amor e companheirismo. Nunca mediram esforços pela minha educação e pela dos meus irmãos.

Peço desculpa por não ser uma filha presente. A vida e todas as suas circunstâncias, fizeram com que eu consiga falar com vocês só pessoalmente, porque afinal vocês continuam morando no mesmo lugar onde nos criaram e às vezes isso leva em torno de um mês ou dois meses. Durante todos estes anos foi muito difícil saber que de certa forma eu teria que me virar sozinha, encarar meus problemas de frente e agradeço muito à vocês por isso, por terem me criado para voar.

Meus irmãos, Marcos, Marilene e Mariane, muito obrigada por sempre me incentivarem a ser a farmacêutica da família, por vocês existirem.

Rafael por ser um namorado paciente e sempre me apoiar nas minhas decisões. A gente se conheceu no meio desse projeto e ninguém como você sabe de todas as angústias que senti para tentar deixá-lo o mais perfeito possível. Obrigada por você ser do jeitinho que é e por ter deixado minha vida mais feliz.

Aos amigos que a UNISC me deu. Só tenho a agradecer por vocês terem entrado na minha vida e permanecerem ao meu lado. São inúmeras amizades que pretendo levar para o resto da vida, obrigada por me proporcionarem os melhores anos da minha vida, nada disso teria sentido sem vocês.

Gostaria de agradecer ao meu grupo de pesquisa, onde fui bolsista de IC por 3 anos. Obrigada pelo companheirismo, pela oportunidade de crescimento, por serem pessoas maravilhosas e principalmente pela amizade de vocês.

À professora Lia que também faz parte do grupo, mas que merece um agradecimento especial por ter me dado a grande oportunidade de entrar na pesquisa, por me ensinar, por acreditar em mim, por ser essa mãe que é. Você sempre será minha eterna orientadora e sempre vou lembrar-me de você, com muito carinho e orgulho.

Ao pessoal da UFRGS que embarcou nesse projeto comigo, muito obrigada. Karina, pelas ideias, pelo apoio e orientação e ao Martin pela paciência, por ter me ensinado e ajudado a executar este projeto. Aprendi muito com vocês nesses últimos meses.

À Laura e ao Rogério do hospital Ana Nery, pelo auxílio no andamento do projeto na instituição, por serem excelentes pessoas, como profissionais e também pela humildade e disposição. Obrigada pelas explicações e por me receberem no bloco cirúrgico.

Gostaria de agradecer as professoras da disciplina de TC Andréia e Lisianne por me proporcionarem a oportunidade da realização deste projeto e todos(as) os(as) professor(as) que convivi durante a graduação, vocês foram fundamentais para realização deste sonho.

A Universidade de Santa Cruz do Sul pela excelente infraestrutura e qualidade de ensino. Obrigada por todas as oportunidades que tive durante estes 6 anos de graduação.

A todos que contribuíram de alguma maneira para realização deste projeto, o meu muito obrigada.

“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria acesso o sentimento, de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender, tudo o que foi ensinado pelo tempo afora...

Lembraria os erros que foram cometidos, para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável: Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída”

Mahatma Gahdhi

RESUMO

No Brasil, estima-se 28.190 casos novos de câncer de pulmão em 2016. Transição Epitelial Mesenquimal (EMT) é uma das principais vias envolvidas na progressão e metástase tumoral. No processo da EMT, as células epiteliais diminuem a expressão do marcador de células epiteliais, como a E-caderina, e aumentam a expressão dos marcadores do citoesqueleto de células mesenquimais, tais como Vimentina. Uma melhor compreensão destes marcadores envolvidos na patogênese e progressão do câncer de pulmão pode levar a estratégias novas e mais eficazes para a detecção precoce e tratamento direcionado. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram caracterizar epidemiologicamente os pacientes com câncer de pulmão do Hospital Ana Nery, avaliar e quantificar a expressão da E-caderina e Vimentina em tecido pulmonar com e sem tumor e relacionar a expressão dos marcadores com as características clínicas e o prognóstico dos pacientes envolvidos neste estudo. Realizou-se um estudo analítico transversal quantitativo e prospectivo incluindo sete pacientes com suspeita de Câncer de Pulmão atendidos no Centro de Oncologia Integrado (COI) do Hospital Ana Nery, Santa Cruz do Sul/RS. Foram obtidos dados clínicos, epidemiológicos e amostras tumorais e não tumorais de pulmão. O programa SPSS 20.0 foi utilizado para realizar as análises descritivas. RT-qPCR foi utilizada para analisar a expressão de E-caderina e Vimentina nas amostras tumorais e livre de tumor e a determinação dos níveis de expressão dos genes alvo foi realizada pela quantificação relativa, utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Três pacientes foram excluídos da análise após avaliação dos resultados do exame anátomo-patológico, que indicou ausência de tumor. Dentre os indivíduos confirmados com câncer de pulmão selecionados para este estudo, houve predomínio de caucasianos, em idade adulta avançada, apresentando alta carga tabágica em longo período de tempo. Comorbidades e elevado índice de histórico de câncer na família, também foram encontrados. Pode-se notar que os pacientes encontravam-se em estágio inicial da doença. Ao comparar os marcadores da expressão gênica entre os grupos de amostras tumorais *versus* não tumorais, houve aumento da expressão dos dois marcadores nas amostras tumorais, quando comparadas ao controle (tecido não tumoral), porém esse aumento mostrou-se significativo apenas para E-caderina ($p < 0,05$). Apesar do pequeno número de amostras, os resultados sugerem que a EMT não está associada com a progressão do tumor nos pacientes com Câncer de Pulmão de não Pequenas Células. Além disso, E-caderina apresentou-se como um possível gene supressor tumoral. Até o momento não foi possível avaliar a progressão da doença após ressecção cirúrgica.

Palavras-chave: Câncer de Pulmão, EMT, E-caderina, Vimentina.

ABSTRACT

In Brazil, an estimated 28,190 new cases of lung cancer in 2016. Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) is one of the main pathways involved in tumor progression and metastasis. In the case of EMT, epithelial cells decrease the expression marker of epithelial cells, such as E-cadherin, and increase the expression of cytoskeletal markers of mesenchymal cells such as vimentin. A better understanding of these markers involved in the pathogenesis and progression of lung cancer can lead to new and more effective strategies for early detection and targeted treatment. Thus, the objectives of this study were to characterize epidemiologically patients with lung cancer Hospital Ana Nery, evaluate and quantify the expression of E-cadherin and vimentin in lung tissue with and without tumor and correlate the expression of markers with clinical characteristics and the prognosis of patients involved in this study. We conducted a quantitative and prospective cross-sectional study including seven patients with suspected lung cancer treated at the Integrated Oncology Centre (IOC) Hospital Ana Nery, Santa Cruz do Sul / RS. Clinical, epidemiological and tumor samples and non-tumor lung data were obtained. SPSS 20.0 software was used for descriptive analysis. RT-qPCR was used to analyze the expression of E-cadherin and vimentin in tumor samples and tumor-free and determination of the target gene expression levels was performed by relative quantification using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Three patients were excluded from analysis after evaluation of the results of the pathological examination, which indicated the absence of tumor. Among individuals with confirmed lung cancer selected for this study, there was a predominance of Caucasians in advanced adulthood, with high load smoking long period of time. Comorbidities and historically high rate of cancer in the family, were also found. It may be noted that the patients were in the early stages of the disease. By comparing the markers of gene expression between groups of tumor samples versus non-tumor, there was increased expression of both markers in tumor samples compared to control (non-tumor tissue), but this increase was significant only for E-cadherin ($p < 0.05$). Despite the small number of samples, the results suggest that the EMT is not associated with tumor progression in patients with lung cancer non-small cell. In addition, E-cadherin was presented as a possible tumor suppressor gene. So far it was not possible to assess the progression of disease after surgical resection.

Keywords: Lung Cancer, EMT, E-cadherin, Vimentin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Classificação dos diferentes subtipos histológicos de câncer de pulmão de não pequenas células	19
Figura 02: Tipos de ressecção cirúrgica	23
Figura 03: EMT - Modificação de um fenótipo epitelial para um mesenquimal	25
Figura 04: Representação esquemática das vias de transdução de sinal associadas com a EMT	27
Figura 05: Fluxograma das etapas realizadas	36
Figura 06: Avaliação da qualidade do RNA total extraído a partir de tecido pulmonar utilizando diferentes protocolos (CSG e FGI)	38
Figura 07: Imagem da amplificação dos marcadores	39
Figura 08: Comportamento do normalizador 18S comparado com os resultados de Ct das amostras tumorais	40
Figura 09: Comportamento do normalizador 18S comparado com os resultados de Ct das amostras controles	40
Figura 10: Quantificação relativa dos marcadores de interesse em tecido tumoral e tecido livre de tumor	42
Figura 11: Resultados comparando a expressão dos marcadores em todos os pacientes	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Descrição da classificação clínica para estadiamento de CPNPC	20
Tabela 02: Estadiamento por grupos	21
Tabela 03: Classificação do câncer de pulmão de pequenas células de acordo com VALCSG	22
Tabela 04: Componentes da mistura de reação para qPCR	34
Tabela 05: Sequência dos primers projetados para os genes-alvo e o gene normalizador	34
Tabela 06: Concentrações de RNA antes e após tratamento com DNase e volumes utilizados na síntese de cDNA	39
Tabela 07: Características epidemiológicas dos sujeitos de estudo	41
Tabela 08: Dados clínicos dos pacientes	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	Erro! Indicador não definido.
3.1 Câncer.....	Erro! Indicador não definido.
3.2 Dados Epidemiológicos	Erro! Indicador não definido.
3.3 Fatores de Risco	Erro! Indicador não definido.
3.4 Sintomas e Diagnóstico.....	Erro! Indicador não definido.
3.5 Tipos Histológicos	Erro! Indicador não definido.
3.6 Estadiamento	Erro! Indicador não definido.
3.7 Tratamento do câncer de pulmão.....	Erro! Indicador não definido.
3.7.1 Tratamento Cirúrgico.....	Erro! Indicador não definido.
3.7.2 Tratamento não cirúrgico.....	Erro! Indicador não definido.
3.8 Transição Epitelial Mesenquimal (EMT).....	Erro! Indicador não definido.
3.8.1 E-caderina	Erro! Indicador não definido.
3.8.2 Vimentina	Erro! Indicador não definido.
4. MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
4.1 Tipo e local da pesquisa.....	Erro! Indicador não definido.
4.2 População e amostra	Erro! Indicador não definido.
4.3 Critérios de inclusão.....	Erro! Indicador não definido.
4.4 Codificação e armazenamento de dados e amostras.....	Erro! Indicador não definido.
4.5 Procedimentos Metodológicos	Erro! Indicador não definido.
4.5.1 Extração de RNA.....	Erro! Indicador não definido.
4.5.2 Síntese de cDNA e análise quantitativa por PCR em tempo real.....	Erro! Indicador não definido.
4.6 Análise de dados.....	Erro! Indicador não definido.
4.7 Fluxograma	Erro! Indicador não definido.
4.8 Divulgação dos dados da pesquisa.....	Erro! Indicador não definido.
4.9 Considerações éticas	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS.....	14

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão apresentou uma incidência de 1,82 milhões de novos casos em 2012, de acordo com a última estimativa mundial. No Brasil, estima-se 28.190 casos novos da patologia em 2016 (INCA, 2015). Na região Sul do país, o câncer de pulmão em homens é o segundo mais frequente (33,62/100mil) e em mulheres é o terceiro (21,35/100mil) (INCA, 2014a).

É o mais comum de todos os tumores malignos (MEDICAL NEWS TODAY, 2016) e inclui vários tipos histológicos, sendo o câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC) responsável por 75 a 80% dos casos (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2016). Mais de 80% dos pacientes identificados com a patologia apresentam histórico tabágico (INCA, 2014a). Susceptibilidade genética e comorbidades desempenham um papel que também contribuem para o desenvolvimento da doença (INCA, 2014a; SIGEL et al., 2013; RAGIN et al., 2014; LIN et al., 2014; PENG et al., 2015).

O procedimento cirúrgico é o tratamento de escolha em estádios precoces. Esta modalidade terapêutica oferece maior chance de cura (VIEIRA et al., 2012). Porém, a sobrevivência global ainda é pequena, pois normalmente a doença encontra-se em estágio avançado no momento do diagnóstico e o tratamento com radioterapia e quimioterápicos, surte pequenos efeitos (TOLOZA, D'AMICO, 2005).

A transformação maligna do câncer de pulmão vem sendo revelada por diversos marcadores moleculares, resultando na ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumores. Vários mecanismos angiogênicos podem ser importantes em diferentes tipos e/ou fases de progressão neoplásicas (KALLURI, WEINBERG, 2009). Uma das principais vias envolvidas no aumento da angiogênese tumoral é a Transição Epitelial Mesenquimal (EMT).

A EMT é um processo biológico que permite que uma célula epitelial polarizada, sofra modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, as quais resultam na aquisição de um fenótipo de célula mesenquimal, cuja capacidade de migração, invasão e resistência a apoptose aumenta. Este processo tem sido relacionado com a embriogênese, fibrose, progressão e metástase de tumores (KALLURI, WEINBERG, 2009).

Na progressão do tumor, células geradas pela EMT podem invadir e metastatizar através da circulação (KALLURI, WEINBERG, 2009). No processo da

EMT, as células epiteliais diminuem a expressão de marcadores de células epiteliais, tais como proteínas de superfície, como a E-caderina, e aumentam a expressão de marcadores do citoesqueleto de células mesenquimais, tais como Vimentina (XIAO, HE, 2010).

Estes marcadores epiteliais e mesenquimais vêm sendo utilizados para determinar a presença de EMT em tecidos tumorais e apresentam forte relação com a progressão da doença. A perda de expressão de E-Caderina e o aumento da expressão de Vimentina já vem sendo investigados em estudos com câncer de mama (BAE et al., 2015; LIU, 2015) e câncer de esôfago (LIU et al., 2014).

Uma melhor compreensão do papel destes marcadores na patogênese e progressão do câncer de pulmão pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias para a detecção precoce da progressão tumoral e tratamentos mais eficazes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de marcadores associados à Transição Epitelial Mesenquimal em tecido tumoral e tecido livre de tumor em pacientes com câncer de pulmão.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar epidemiologicamente os pacientes com câncer de pulmão atendidos no Hospital Ana Nery;
- ✓ Avaliar e quantificar a expressão da E-caderina e Vimentina em tecido pulmonar com e sem tumor;
- ✓ Relacionar a expressão dos marcadores com as características clínicas e com o prognóstico dos pacientes envolvidos neste estudo.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula. Estrutura da membrana: organização interna da célula*; Porto Alegre: *Artmed*. 4ª ed. p.583-614. 2004.
- AL-SAAD, S. et al. The prognostic impact of NF- κ B p105, vimentin, E-cadherin and Par6 expression in epithelial and stromal compartment in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer*. v.99, p.1476–1483. 2008.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures 2015*. Atlanta: American Cancer Society. 2015.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. What are the risk factors for small cell lung cancer?. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-smallcell/detailedguide/small-cell-lung-cancer-risk-factors>> Acesso em Abril/2016. 2016a.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Lung Cancer (Non-Small Cell) What is cancer? Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-what-is-non-small-cell-lung-cancer>> Acesso em Abril/2016. 2016b.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Lung Cancer (Non-Small Cell). Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-diagnosis>> Acesso em Abril/2016. 2016c.
- AVIV, A.; AVIV, H. Reflections on telomers, growth, aging and essential hypertension. *Hypertension*. v.29, p.1067–72. 1997.
- BAE, Y. K. et al. Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype Is Associated with Clinicopathological Factors That Indicate Aggressive Biological Behavior and Poor Clinical Outcomes in Invasive Breast Cancer. *Journal of Breast cancer*. v.18, n.3, p.256-263. 2015.
- BARROS, R. L. S. Validação do uso da proteína cofilina como biomarcador preditivo do prognóstico de carcinoma de pulmão de não-pequenas células. *Dissertação de mestrado*. Faculdade de Medicina. Porto Alegre. 2010.
- BATLLE, E. et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology*. v.2, n.00, p.84-89. 2000.
- BEAVON, I. R. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *European Journal of Cancer*. v.36, n.00, p.1607-1620. 2000.
- BIBLIOMED. Capítulo 05 - Ressecção Pulmonar. Disponível em: <<http://www.bibliomed.com.br/bibliomed/bmbooks/cirurgia/livro7/cap/cap05.htm>> Acesso em Maio/2016. 2016.

- BINDELS, S. et al. Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene*. v.25, p.4975–4985. 2006.
- BOYER, B.; VALLES, A. M.; EDME, N. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochemical Pharmacology*. v.60, n.00, p.1091-1099. 2000.
- BREMNES, R. M. et al. High-Throughput Tissue Microarray Analysis Used to Evaluate Biology and Prognostic Significance of the E-Cadherin Pathway in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. v.20, n.10, p.2417-2428. 2002.
- BROCK, M. V. et al. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med*. v.358, p.1118–1128. 2008.
- CANCER RESEARCH. 2013. Who can take part in a clinical trial. Disponível em: <<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/find-a-clinical-trial/how-to-join-a-clinical-trial/who-can-take-part-in-a-clinical-trial>> Acesso em: Março/2016.
- CANO, A. et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology*. v.2, n.00, p.76-83. 2000.
- CARSTENSEN, B.; WITTE, D. R.; FRIIS, S. Cancer occurrence in Danish diabetic patients: duration and insulin effects. *Diabetologi*. v.55, p.948–958. 2012.
- CATTS, V. S. et al. A microarray study of post-mortem mRNA degradation in mouse brain tissue. *Brain Res Mol Brain Res*. v.138, p.164–177. 2005.
- CHEN, H. F. et al. Risks of Breast and Endometrial Cancer in Women with Diabetes: A Population-Based Cohort Study. *PLOS ONE*. v.8, n.6, e67420. 2013a.
- CHEN, L. S.; KAPHINGST, K. A. Risk Perceptions and Family History of Lung Cancer: Differences by Smoking Status. *Health Genomics*. v.14, p.26–34. 2010.
- CHEN, Y. L. et al. Diabetes and risk of subsequent gastric cancer: a population-based cohort study in Taiwan. *Gastric Cancer*. v.16, p.389–396. 2013b.
- CHEN, Z. M. et al. Emerging Tobacco-Related Cancer Risks in China: A Nationwide, Prospective Study of 0.5 Million Adults. *Cancer Research*. p. e60317. 2015.
- CHOI, Y. S. et al. Prognostic significance of E-cadherin and b-catenin in resected stage I non-small cell lung cancer. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. v.24, p.441–449. 2003.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. v.162, p.156–159. 1987.

COLOMBO, J.; RAHAL, P. A tecnologia de microarray no estudo do câncer de cabeça e pescoço. *Brazilian Journal of Biosciences*. v.8, n.1, p.64-72. 2010.

COPOIS, V. et al. Impact of RNA degradation on gene expression profiles: Assessment of different methods to reliably determine RNA quality. *J Biotechnol*. v.127, p.549–559. 2007.

COSTA Jr, A. S. Abordagem cirúrgica do câncer de pulmão: lobectomia ou ressecções sublobares?. *Pneumologia Paulista*. v.26, n.1. 2012.

COTÉ, M. L. et al. Increased risk of lung cancer in individuals with a family history of the disease: A pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Eur J Cancer*. v.48, n.13, p.1957–1968. 2012.

DINIZ-FREITAS, M. et al. Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. v.42, n.00, p.190–200. 2006.

DUBEY, S.; POWELL. C. A. Update in lung cancer 2007. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. v.177, n.9, p.941-946. 2008.

FRIXEN, U. H. et al. E-Cadherin-mediated Cell-Cell Adhesion Prevents Invasiveness of Human Carcinoma Cells. *The Journal of Cell Biology*. v.1, n.13, p.173-185. 1991.

GAO, X. et al. DNA methylation changes of whole blood cells in response to active smoking exposure in adults: a systematic review of DNA methylation studies. *Clinical epigenetics*. v.7, p.113. 2015.

GIOVANNUCCI, E. et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care*. v.33, p.1674–1685. 2010.

GU, J. et al. Systematic review of the relationship between family history of lung cancer and lung cancer risk. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. v.13, n.3, p.224–9. 2010.

HAMET, P. Cancer and hypertension: a potential for crosstalk? *J Hypertens*. v.15, p.1573–7. 1997.

HAMMERSCHMIDT, S.; WIRTZ, H. Lung Cancer: Current Diagnosis and Treatment. *Deutsches Ärzteblatt international*. v.106, n.49, p.809–20. 2009.

HEMMINKI, K. et al. Risk of cancer following hospitalization for type 2 diabetes. *Oncologist*. v.15, p.548–555. 2010.

HOSSEINI, M. et al. Environmental risk factors for lung cancer in Iran: a case–control study. *International Journal of Epidemiology*. v.38, p.989–996. 2009.

INAL, A. et al. Is diabetes mellitus a negative prognostic factor for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer? *Rev Port Pneumol.* v.20, n.2, p.62-68. 2014.

INCA - Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva, "Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil," Ministério da Saúde, Brasil, 2014a.

INCA - Atlas de Mortalidade por Câncer – Versão 2014. Disponível em: <<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>> Acesso em Março/2016. 2014b.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro, 2015.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Condutas do INCA. BRASIL. Ministério da Saúde. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v .49, n. 3, p. 149-152. 2003.

INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER. TNM: classification of malignant tumours. New York: Wiley-Liss, 2002.

IVASKA, J. et al. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration and signaling. *Experimental Cell Research.* v.313, p.2050-62. 2007.

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

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* v.61, p.69-90. 2011.

JIN, Y. T. et al. Familial aggregation of lung cancer in a high incidence area in China. *British Journal of Cancer.* v.92, p.1321–1325. 2005.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation.* v.119, p.1420-8. 2009.

KASE, S. et al. Expression of E-cadherin and b-Catenin in Human Non-Small Cell Lung Cancer and the Clinical Significance¹. *Clinical Cancer Research.* v.6, p.4789–4796. 2000.

KERR, K. M. et al. The role of DNA methylation in the development and progression of lung adenocarcinoma. *Disease Markers.* v.23, p.5–30. 2007.

LARGENT, J. A. et al. Hypertension, diuretics and breast cancer risk. *J Hum Hypertens.* v.20, n.10, p.727–732. 2006.

LEE, J. M. et al. The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *Journal of Cell Biology.* v.172, n.7, p.973–981. 2005.

- LEE, K. W.; PAUSOVA, Z. Cigarette smoking and DNA methylation. *Frontiers in genetics*. v.4, n.132. 2013.
- LIN, G. N. et al. Hepatitis B virus reactivation in hepatitis B surface antigen seropositive patients with metastatic non-small cell lung cancer receiving cytotoxic chemotherapy: the efficacy of preemptive lamivudine and identification of risk factors. *Medical Oncology*. v.31, n.119. 2014.
- LIN, Q. et al. Prognostic Impact of Vascular Endothelial Growth Factor-A and E-Cadherin Expression in Completely Resected Pathologic Stage I Non-Small Cell Lung Cancer. *Japanese Journal Clinical Oncology*. v.40, n.7, p.670–676. 2010.
- LINDGREN, A. M. et al. Cancer pattern among hypertensive patients in North Karelia, Finland. *J Hum Hypertens*. v.19, n.5, p.373–379. 2005.
- LIU, C. Y. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*. v.6, n.18, p.15966-15983. 2015.
- LIU, J. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in human esophageal cancer associates with tumor progression and patient's survival. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. v.7, n.10, p.6943-6949. 2014.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods*. v.25, p. 402-408. 2001.
- MATAKIDOU, A. Case-control study of familial lung cancer risks in UK women. *Int. J. Cancer*. v.116, p.445–450. 2005.
- MATAKIDOU, A.; EISEN, T.; HOULSTON, R. S. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer*. v.93, n.7, p.825–33. 2005.
- MAYNE, S. T.; BUENCONSEJO, J.; JANERICH, D. T. Familial cancer history and lung cancer risk in United States nonsmoking men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. v.8, p.1065–9. 1999.
- MEDICAL NEWS TODAY: Health News. Lung Cancer: Facts, Types and Causes. Disponível em: <<http://www.medicalnewstoday.com/info/lung-cancer/>> Acesso em Maio/2016.
- MOREAU, P. et al. Altered balance between cell replication and apoptosis in hearts and kidneys of newborn SHR. *Hypertension*. v.29, p.720–4. 1997.
- MORENO-BUENO, G. et al. Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Research*. v.66, p.9543-56. 2006.

MUYAL, J. P. et al. Systematic comparison of RNA extraction techniques from frozen and fresh lung tissues: checkpoint towards gene expression studies. *Diagn Pathol.* v.4, n.9. 2009.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Non-Small Cell Lung Cancer Treatment –for health professionals (PDQ®). Disponível em: <<http://www.cancer.gov/types/lung/hp/non-small-cell-lung-treatment-pdq>>. Acesso em Março/2016.

OLMEDA, D. et al. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene.* v.26, p.1862–1874. 2007.

PAOLACCI, A. R. et. al. Identification and validation of reference genes for quantitative RTPCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology.* v.10, n.11. 2009.

PENG, J. W. et al. Hepatitis B Virus Infection Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Advanced Non Small Cell Lung Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* v.16, n.13, p.5285-5288. 2015.

PERL, A. K. et al. Acausal role for E-cadherin in the transition from adenomato carcinoma. *Nature.* v.392, n.12. 1998.

POSTIGO, A. A. et al. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO Journal.* v.22, p.2453-62. 2003.

RAGIN, C. et al. HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis. *Carcinogenesis.* p.1-9. 2014.

RISCH, A.; PLASS, C. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int. J. Cancer.* v.123, p.1–7. 2008.

ROY, E. V.; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences.* v.65, p.3756–3788. 2008.

RYU, T. Y.; PARK, J.; SCHERER, P. E. Hyperglycemia as a Risk Factor for Cancer Progression. *Diabetes Metab J.* v.38, p.330-336. 2014.

SAMSON, P. et al. Multidisciplinary Treatment for Stage IIIA Non-Small Cell Lung Cancer: Does Institution Type Matter?. *Ann Thorac Surg.* v.100, p.1773–9. 2015.

SCHROEDER, A. et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* v.31, n.3. 2006.

SELAMAT, S. A. et al. Genome-scale analysis of DNA methylation in lung adenocarcinoma and integration with mRNA expression. *Genome research*. v.22, p.1197-1211. 2012.

SHIEH, S. H. et al. Decreased survival among lung cancer patients with co-morbid tuberculosis and diabetes. *BMC Cancer*. v.12, n.174. 2012.

SHIRAKIHARA, T.; SAITOH, M.; MIYAZONO, K. Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta. *Molecular Biology of the Cell*. v.18, p.3533-44. 2007.

SIGEL, K. et al. Prognosis in HIV-infected patients with non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*. v.109, p.1974–1980. 2013.

SOBUS, S. L.; WARREN, G. W. The Biologic Effects of Cigarette Smoke on Cancer Cells. *Cancer*. 2014.

SOBUS, S. L.; WARREN, G. W. The Biologic Effects of Cigarette Smoke on Cancer Cells. *Cancer*. 2014.

TADOKORO, A. et al. Vimentin Regulates Invasiveness and Is a Poor Prognostic Marker in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Research*. v.36, p.1545-1552. 2016.

TAM, W. L.; WEINBERG, R. A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature Medicine*. v.19, n.11. 2013.

THIERY, J. P. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature*. v.2, 2002.

THIERY, J. P. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. v.139, p.871-90. 2009.

THOMPSON, E. W.; D. F. NEWGREEN. Carcinoma Invasion and Metastasis: A Role for Epithelial-Mesenchymal Transition?. *Cancer Research*. v.65, n.14. 2005.

THOMPSON, E. W.; NEWGREEN, D. F. Carcinoma Invasion and Metastasis: A Role for Epithelial-Mesenchymal Transition? *Journals American Association for Cancer Research*. v.65, n.14. 2005.

THUAULT, S. et al. HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *Journal Biological Chemistry*. v.283, p.33437-33446. 2008.

TING, A. H.; MCGARVEY, K. M.; BAYLIN, S. B. The cancer epigenome--components and functional correlates. *Genes & Development*. v.20, p.3215-31. 2006.

- TOLOZA, E. M.; D'AMICO, T. A. Targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* v.17, n.3, p.199-204. 2005.
- TSENG, C. H. Diabetes but Not Insulin Increases the Risk of Lung Cancer: A Taiwanese Population-Based Study. *PLOS ONE.* v.9, n.7, e101553. 2014.
- VALCOURT, U. et al. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Molecular Biology of the Cell.* v.16, p.1987-2002. 2005.
- VIEIRA, C. S. et al. *Oncologia Básica.* 1ªed. Teresina, PI. Fundação Quixote. 2012.
- VINCENT, T. et al. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nature Cell Biology.* v.11, p.943-950. 2009.
- VOGELSTEIN, B.; GILLESPIE, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Biochemistry.* v.76, n.2, p.615-619. 1979.
- WHEELOCK, M. J.; JOHNSON, K. R. Cadherins Asmodulators of Cellular Phenotype. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v.19, p.207–35. 2003.
- WHO, World Health Organization. Media centre. Câncer. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acesso em Fevereiro/2016.
- WIERMANN, E. G. et al. *Oncologia Clinica. Revista da Sociedade Brasileira de Oncologia Clinica. Manuais de Condutas.* 2011.
- WU, A. H. et al. Family history of cancer and risk of lung cancer among lifetime nonsmoking women in the United States. *Am J Epidemiol.* v.143, p.535–42. 1996.
- XIAO, D.; HE, J. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *Journal of Thoracic Disease.* v.2, p.154-159. 2010.
- XIE, L. et al. Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia.* v.6, p.603-10. 2004.
- YANG, J. et al. Twist, a master Regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* v.117, p.927–939. 2004.
- YEO, Y. et al. Diabetes Mellitus and Risk of Thyroid Cancer: A Meta-Analysis. *PLOS ONE.* v.9, n.6, e98135. 2014.
- YUAN, P. et al. Time-to-Progression of NSCLC from Early to Advanced Stages: An Analysis of data from SEER Registry and a Single Institute. *Scientific Reports.* p.6-28477. 2016.

ZEISBERG, M.; NEILSON, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *Journal of Clinical Investigation*. v.119, p.1429-37. 2009.

ZHANG, Y. Family History of Cancer and Risk of Lung Cancer among Nonsmoking Chinese Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. v.16, n.11. 2007.