Bianca Rodrigues da Cunha

**Investigação do perfil de expressão gênica e protéica de
componentes do microambiente tumoral**

Investigation of gene and protein expression profile of tumor
microenvironment elements

São Paulo

2011

Bianca Rodrigues da Cunha

**Investigação do perfil de expressão gênica e protéica de
componentes do microambiente tumoral**

Investigation of gene and protein expression profile of tumor
microenvironment elements

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Versão Corrigida. A versão original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

Orientadora: Eloiza Helena Tajara da Silva

São Paulo

2011

Cunha, Bianca Rodrigues da
Investigação do perfil de expressão gênica e
protéica de componentes do microambiente
tumoral
126 páginas
Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo. Departamento
de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Microambiente tumoral. 2. Expressão gênica e
protéica.

Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva
Orientadora

Dedico

Aos meus pais e irmãos

Ao Thiago

O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.

Thomas Henry Huxley

Agradecimentos

Aos pacientes, que doaram voluntariamente as amostras para essa pesquisa.

À minha orientadora, Dra Eloiza Helena Tajara da Silva, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho, por sua incansável dedicação e incentivo.

Ao Dr. Chin Jia Lin por me receber em seu laboratório e por todos os ensinamentos durante o processo de microdissecção a laser, possibilitando assim o desenvolvimento desse processo.

Aos Doutores Luiz Fernando Ferraz da Silva, Thais Mauad e Patrícia Maluf Cury por possibilitarem o processo de microdissecção.

Ao pessoal da patologia Luiz, Priscila, Keid, Ana Paula e Kelly pela ajuda na seleção de amostras e no preparo das lâminas.

Ao Prof. Dr Carlos Alberto Labate e a Dra Adriana Paes Leme por me receberem em seus laboratórios e possibilitarem os experimentos de espectrometria de massas.

Às Doutoradas Fernanda Salvato, Bianca e Tais por me ajudarem com o processo e análise dos dados de espectrometria de massas.

À Sônia e seu marido que prontamente me receberam em sua casa. Muito obrigada.

Aos coordenadores e funcionários do programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Biociências da USP.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro.

Aos pesquisadores do grupo GENCAPO (Head and Neck Genome Project) responsáveis pela coleta das amostras biológicas e respectivas análises patológicas.

Aos amigos do Laboratório Flávia, Ulises, Giovana, Flávio, Alessandra, Tiago, Rodrigo, Fernanda, Caique, Natália, Juliana, Jaqueline, Célia, Janesly, Larissa e Carol.

Aos meus pais Aires e Paula pelo apoio, dedicação e incentivo, pelos momentos em que me fortaleceram com sabedoria, coerência e lucidez. Vocês são meus alicerces, são meus pontos de equilíbrio e são meus melhores exemplos.

Aos meus irmãos Felipe e Bruno pelas inúmeras discussões e constantes aprendizados.

Às minhas avós Magali e Teresinha pelo amor e pela compreensão.

Aos meus sogros pelo carinho e acolhimento.

Ao meu namorado Thiago por me tornar uma pessoa melhor. Obrigada pelo carinho, dedicação e amor.

Sumário

INTRODUÇÃO.....	1
Microambiente tumoral.....	1
Elementos do estroma tumoral.....	4
Células endoteliais.....	4
Células inflamatórias.....	4
Fibroblastos	9
Alguns dados epidemiológicos sobre o câncer	13
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
Metodologia	17
Cultura de Linhagens Celulares	17
Microdissecção a <i>laser</i>	20
Extração de RNA, DNA e proteínas	24
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pela transcriptase reversa	29
Amplificação do RNA e síntese de cDNA de tecidos microdissecados a laser	29
Análise por PCR em Tempo Real	30
Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida	33
Digestão de proteínas	33
Identificação de proteínas	34
Análise Estatística.....	35
RESULTADOS	36
Casuística	36
Microdissecção a <i>laser</i>	37
Extração de RNA e obtenção de cDNA.....	37
Seleção de genes de interesse	40
PCR em tempo real.....	45
Eletroforese unidimensional	57
Espectrometria de massas.....	57
DISCUSSÃO.....	60
CONCLUSÕES.....	65
RESUMO	66
ABSTRACT.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
Anexo 1	74
Anexo 2	99
Anexo 3	108
Apêndice.....	111

Introdução

Microambiente tumoral

Há uma década, Hanahan e Weinberg (2000) propuseram um conjunto de seis *hallmarks* ou características adquiridas durante o desenvolvimento do câncer, na tentativa de simplificar a complexidade da doença neoplásica. Nesse conjunto, os autores incluíram auto-suficiência em sinais de proliferação, insensibilidade a supressores de crescimento, resistência a apoptose, capacidade replicativa ilimitada, angiogênese sustentada e capacidade para invasão e metástase. Em sua revisão recente, Hanahan e Weinberg (2011) reconheceram a importância da instabilidade genômica, geradora de diversidade genética, e da inflamação, que fomenta as demais características do câncer. Além disso, em função das inúmeras informações e conceitos que surgiram na última década, acrescentaram para a lista de *hallmarks* dois outros traços, a reprogramação do metabolismo energético e a evasão ao ataque imune. Também chamaram atenção para um grupo de parceiros normais das células neoplásicas, que criam um microambiente propício para a aquisição do fenótipo tumoral.

Realmente, existem muitas evidências de que o desenvolvimento e a progressão do câncer dependem não somente de suas características genéticas, mas também de sua interação com as células vizinhas (De Wever, Demetter *et al.*, 2008), de modo similar ao que ocorre durante o desenvolvimento e a função de órgãos normais (Mueller e Fusenig, 2004).

O microambiente tumoral compreende, além do componente neoplásico, um estroma não-maligno “reativo” essencial para a sobrevivência do primeiro, caracterizado por densidade aumentada de microvasos, grande número de células inflamatórias e do sistema imune – linfócitos, macrófagos e mastócitos – fibroblastos, mioblastos e adipócitos (Dvorak, 1986; Li, Fan *et al.*, 2007; Chechinska, Kowalewska *et al.*, 2010; Franco, Shaw *et al.*, 2010). Embora seja formado por células normais, o estroma definitivamente não é um tecido normal. Seus elementos são capazes de migrar, proliferar e produzir fatores importantes para o reparo tecidual (Powell, Mifflin *et al.*, 1999). Juntos, os dois componentes desse microambiente secretam a matriz extracelular (ECM), que coordena os sinais para proliferação, anti-apoptose, angiogênese, invasão e metástase, e também constroem uma barreira eficiente contra muitos agentes terapêuticos (Kaur, Cripe *et al.*, 2009).

A matriz extracelular no tecido normal contém fibras de colágeno e glicosaminoglicanos. Nos tumores, por causa da densidade capilar elevada e dos vasos sanguíneos irregulares com alta permeabilidade, ocorre extravasão de proteínas

plasmáticas, como a fibrina, que atrai o influxo de novos fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais. Em relação aos tecidos normais, o estroma neoplásico possui quantidades elevadas de colágeno, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (Figura 1) (Wiig, Tenstad *et al.*, 2010).

Esse é o quadro simplificado do microambiente tumoral, fruto de adaptação a forças seletivas que agem durante a tumorigênese e que são responsáveis pela seleção de clones celulares com mutações genéticas e epigenéticas importantes para os *hallmarks* da população maligna (Gatenby e Gillies, 2008).

Tanto as células neoplásicas podem alterar o estroma vizinho por contato direto ou via secreção de fatores solúveis parácrinos, induzindo modificações na matriz extracelular (Micke e Ostman, 2004), como as células estromais podem promover a progressão do câncer e estimular a invasão de outros tecidos (Zalatnai, 2006). Além disso, fatores externos participam desse diálogo, alterando o microambiente. É o caso de drogas como a aspirina, que afeta o pH e o nível de glicose, oxigênio, lactato e citocinas do microambiente (Kumar, Vishvakarma *et al.*, 2011). O próprio padrão de metastatização e colonização de um novo sítio anatômico depende certamente das características do fenótipo tumoral e do estroma. Por exemplo, um tropismo diferencial ocorre em tumores de mama, que frequentemente migram para pulmão, osso e cérebro, enquanto tumores de cabeça e pescoço possuem como alvo preferencial os linfonodos regionais (Genden, Ferlito *et al.*, 2003; Joyce e Pollard, 2009).

Figura 1. Estroma normal (a) e estroma tumoral (b) mostrando a densidade aumentada de microvasos, fibroblastos, células inflamatórias e do sistema imune (modificado de Kalluri, 2003).

Elementos do estroma tumoral

Células endoteliais

Os vasos sanguíneos são elementos críticos para o processo neoplásico, desde a progressão de uma condição benigna para maligna até o fenótipo invasivo.

A angiogênese é controlada pela secreção de fatores pró e antiangiogênicos. Após a ação de estímulos específicos decorrentes da tentativa de suprir necessidades metabólicas, ocorre proliferação de células progenitoras ou diferenciadas do endotélio, seguida de maturação dos novos elementos em vasos sanguíneos funcionais. No tumor, ocorre secreção aumentada de fatores proangiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular/VEGF (Folkman, 2003) e a expressão de seus receptores, como o VEGFR2 (Mueller e Fusenig, 2004) (Figura 2). Entretanto, os novos vasos resultantes desse processo anormal são aberrantes e não conseguem realizar uma perfusão adequada no tumor, o que leva a uma hipóxia elevada mesmo na presença de densidade crescente de microvasos (Kaur, Cripe *et al.*, 2009). Esse estado hipóxico induz novamente a um processo de formação de novos vasos.

Células inflamatórias

A abundância de células inflamatórias é outra característica do microambiente tumoral, sendo seu papel na progressão neoplásica foco de muita discussão. A idéia de que a inflamação está envolvida na tumorigênese é apoiada pela observação de que o câncer surge freqüentemente em áreas de inflamação crônica. Essa conexão apresenta dois padrões: (a) um extrínseco, coordenado pelas próprias condições inflamatórias que elevam o risco de câncer e (b) um intrínseco, dirigido pelas alterações genéticas que causam inflamação e câncer (como mutações em oncogenes e supressores de tumor) (Figura 3). As evidências desse último padrão vieram das observações de que a maioria ou teoricamente todos os tumores possuem células inflamatórias, mesmo quando não existe base epidemiológica para sua presença (Mantovani, Allavena *et al.*, 2008).

Figura 2. Controle da angiogênese por fatores proangiogênicos liberados por células tumorais e do estroma. Em resposta a metaloproteinases (MMP), a membrana basal vascular é degradada. Na transição da matriz provisória a matriz intermediária e madura, ocorre proliferação e migração de células endoteliais por estímulo de fatores de crescimento vascular (VEGF), de fibroblastos (FGF) e derivados de plaquetas (PDGF), produzidos pela membrana basal e por células tumorais, fibroblastos e células do sistema imune. Juntos com as células endoteliais e os pericitos, a membrana basal modula a formação de novos vasos (modificado de Kalluri, 2003).

Tem sido estimado que cerca de 8–17% dos casos de câncer no mundo são relacionados com infecções crônicas por vírus, bactérias e parasitas (Porta, Riboldi *et al.*, 2011), muitas delas associadas a processos inflamatórios. Os exemplos incluem infecções pelo vírus do papiloma humano (HPV) no câncer de colo de útero (Lee, Kim *et al.*, 2011) e pela bactéria *Helicobacter pylori* no câncer gástrico (Crowe, 2005). Outros processos inflamatórios possuem etiologia diversa, mas também estão ligados ao desenvolvimento neoplásico. É o caso da pancreatite crônica e da colite ulcerativa em câncer de pâncreas e de cólon, respectivamente (Clevers, 2004; Farrow, Sugiyama *et al.*, 2004), doenças autoimunes, como as doenças inflamatórias intestinais em câncer de colorretal, e prostatite em câncer de próstata (Mantovani, Allavena *et al.*, 2008).

No início do processo neoplásico, as células inflamatórias e os fatores que elas produzem devem regular o crescimento, a migração e a diferenciação de todos os tipos celulares no microambiente tumoral incluindo as células neoplásicas, as endoteliais e os fibroblastos. É possível que, posteriormente, as células neoplásicas utilizem alguns mecanismos inflamatórios para invasão de outros tecidos, como adesão de células à parede de vasos e migração ou diapedese por entre as células endoteliais. Esse fato já havia sido destacado por Perretti (1997), por causa da semelhança da metastatização com os estágios da inflamação.

As células inflamatórias secretam numerosas citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, que estimulam a proliferação, inibem a apoptose, induzem a morfogênese e geram espécies reativas de oxigênio que podem lesar o DNA (Coussens e Werb, 2002). Em consequência, promovem um ambiente propício para o processo neoplásico, facilitando a instabilidade genômica (Ronnov-Jessen e Petersen, 1996; Tlsty e Hein, 2001). Além disso, como o VEGF, a angiopoetina e as metaloproteinases estão entre os fatores produzidos pelas células inflamatórias presentes no tumor, também ocorre estímulo para mitose de células endoteliais vasculares e remodelamento da matriz extracelular, que contribuem para a angiogênese (Carmeliet e Jain, 2000).

Portanto, a inflamação gera não somente mudanças no microambiente promotoras de câncer, mas alterações que estimulam a progressão neoplásica. Chechlinska e colaboradores (2010) sugerem apropriadamente que o ambiente inflamatório seja um novo *hallmark* do câncer. O seu entendimento deve auxiliar no desenvolvimento de terapias que têm como alvo essa “outra metade do tumor”, ou seja, os componentes inflamatórios do microambiente (Mantovani, Allavena *et al.*, 2008).

Entre as células inflamatórias do estroma, estão os macrófagos. Essas células monitoram, juntamente com mastócitos e outras células do sistema imune (eosinófilos e neutrófilos, por exemplo), a homeostase de tecidos e células. No seu estado basal, os macrófagos atuam por diferentes mecanismos tecido-específicos. Em situações de estresse, uma série de sinais é enviada para os macrófagos residentes que, por sua vez, produzem níveis elevados de fatores de crescimento ou outros sinais importantes para aquela situação. Em condições extremas, a atuação dos macrófagos locais é insuficiente e outros macrófagos são recrutados (Medzhitov, 2008).

O objetivo dessas interações é permitir que o tecido se adapte às mudanças que ocorreram e restabeleça suas funções. Entretanto, quando o estímulo é crônico ou excessivo, a resposta pode ser nociva, como aquela iniciada por macrófagos recrutados para sítios de inflamação e que contribui para resistência à insulina no tecido adiposo (Medzhitov, 2008).

Os macrófagos associados a tumor são um importante componente do microambiente e podem promover a progressão do câncer por mecanismos ainda não bem esclarecidos (Alderton, 2010). Por exemplo, na adaptação do tecido ao estresse, as células tumorais podem explorar as características dos macrófagos como fonte de fatores de crescimento e angiogênicos e de citocinas ativadoras de respostas inflamatórias. Uma sub-população dessas células parece estar envolvida na promoção de metástases, participando juntamente com monócitos da indução de extravasão, colonização em outros tecidos e proliferação de células tumorais (Qian, Li *et al.*, 2011). Dados prévios sobre o efeito de meio condicionado por macrófagos sobre a estimulação de atividades migratórias e invasivas de células tumorais já evidenciaram esse papel (Lin, Lin *et al.*, 2006). Além de sua atuação no processo metastático, os macrófagos também estão aparentemente relacionados com a imunossupressão desencadeada pelo tumor, que permite a fuga da célula neoplásica ao ataque pelas células do sistema imune (Herreros, Sanchez-Aguilera *et al.*, 2008).

Fibroblastos

Os fibroblastos compreendem o principal componente celular do tecido conjuntivo, onde ficam imersos em uma matriz fibrilar que sintetizam. No estroma normal, estão em pequeno número (Kalluri e Zeisberg, 2006) e, como os macrófagos, atuam na manutenção da homeostase celular suprimindo proliferação das células adjacentes (Erez, Truitt *et al.*, 2010). No estroma tumoral, ao contrário, são observados em grande número ao lado de depósitos de fibrina e colágeno (Kalluri e Zeisberg, 2006). Em muitos carcinomas, a maioria das células estromais são fibroblastos com características miofibroblásticas. Essas células são usualmente denominadas fibroblastos associados a câncer (CAFs) e possuem taxas aumentadas de proliferação e expressão diferencial de componentes da ECM (Nurmenniemi, Sinikumpu *et al.*, 2009).

Os fibroblastos são ativados durante as fases iniciais da tumorigênese quando são induzidos a apresentar um perfil proinflamatório. Esses CAFs modulam o recrutamento de células do sistema imune, como os macrófagos, e promovem a angiogênese, participando da progressão maligna pela via dependente do fator de transcrição NF-kB (Erez, Truitt *et al.*, 2010).

Os fibroblastos ativados do estroma também apresentam um papel importante em câncer como fonte de fatores de crescimento parácrinos que atuam na proliferação das células neoplásicas (Figura 4), mas também como indutores de certos carcinomas. Por exemplo, alguns modelos *in vivo* revelam que a adição de fibroblastos ativados a epitélio iniciado de próstata aumenta dramaticamente a população de células epiteliais enxertadas em camundongos, ao contrário do que ocorre com a adição de fibroblastos normais (Izumi, Xu *et al.*, 2002).

Entre as proteínas derivadas de fibroblastos envolvidas no processo neoplásico estão os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), semelhante a insulina (IGF), epitelial (EGF), de hepatócito (HGF) e transformante β (TGF β). A maioria é estimuladora de proliferação, exceto o TGF β que é regulador negativo do crescimento celular, mas também está envolvido positivamente no desenvolvimento de muitos carcinomas (Bhowmick, Neilson *et al.*, 2004).

Figura 4. Fibroblasto do (a) estroma normal e (b) fibroblasto ativado do estroma tumoral. Os fibroblastos normais estão imersos em uma matriz extracelular fibrilar rica em colágeno do tipo I e fibronectina, são fusiformes e possuem filamentos de vimentina e um citoesqueleto de actina. Esses fibroblastos interagem com seu microambiente por meio de moléculas de integrina do tipo alfa e beta. A proteína de fibroblastos 1 (FSP1) é específica para fibroblastos de tecidos normais. Os fibroblastos do estroma tumoral adquirem um fenótipo ativado, que está associado com atividade proliferativa e secreção elevada de proteínas da matriz extracelular, como colágeno tipo I e tenascina, fibronectina com domínio extra (EDA) e proteína secretada acídica e rica em cisteína (SPARC). Seu fenótipo caracteriza-se pela expressão de actina de músculo liso. A ativação desses fibroblastos depende de fatores de crescimento, quimiocinas e proteases (modificado de Kalluri e Zeisberg, 2006).

Fica evidente dos dados acima que um grande número de padrões de sinalização devem participar das interações célula inflamatória - fibroblasto - célula tumoral (Figura 5). Um exemplo é o padrão de sinalização do NF- κ B, um fator de transcrição cuja ativação é dependente da quinase I κ B (IKK) e que ocorre em resposta a infecções virais e microbianas e a citocinas pró-inflamatórias. O NF- κ B, que está relacionado com a transcrição de genes cujos produtos inibem a apoptose, já foi detectado ativado ou com expressão elevada em muitas neoplasias. Recentemente, foi reconhecido seu papel em tumores precedidos por inflamação crônica, que mostraram tamanho significativamente reduzido após inativação específica de IKK/NF- κ B, provavelmente em consequência da expressão diminuída de citocinas pró-inflamatórias (Greten, Eckmann *et al.*, 2004).

Outra via chave de sinalização, é desencadeada pelo VEGF, que pode ser liberado pelas próprias células tumorais, mas principalmente por fibroblastos e células inflamatórias. O VEGF aumenta a permeabilidade microvascular que permite, como citado acima, a extravasão de proteínas plasmáticas, como a fibrina, e a consequente afluência de fibroblastos e células endoteliais, entre outras. Essas células produzem ECM rica em fibronectina e colágeno tipo I, ambos indutores de angiogênese (Kalluri e Zeisberg, 2006).

Para entendimento do papel do estroma na tumorigênese, algumas abordagens envolvendo a análise da expressão gênica têm sido utilizadas e seus resultados têm revelado diferenças importantes entre os tipos celulares presentes no estroma tumoral e normal. O trabalho de (Allinen, Beroukhim *et al.*, 2004), por exemplo, identificou as quimiocinas CXCL14 e CXCL12 com expressão elevada em fibroblastos do estroma de carcinomas de mama. Esses autores observaram que tais quimiocinas ligam-se a receptores de células epiteliais e aumentam sua proliferação, migração e invasão. O trabalho de Oh, Li *et al.*, (2004) também analisou o perfil protéico do estroma e comparou as proteínas expressas por membranas plasmáticas endoteliais de diferentes tumores e tecido normal adjacente. Os resultados chamaram a atenção para a expressão de uma proteína anti-inflamatória na superfície de células endoteliais, a anexina 1, que foi detectada apenas no material tumoral e não no tecido normal.

Figura 5. Elementos do estroma tumoral (fibroblasto associado a câncer ou FAC, células inflamatórias e endoteliais, pericitos e células neoplásicas), e os fatores de crescimento e citocinas produzidas por essas células. Os fibroblastos comunicam-se com as células tumorais, células epiteliais, endoteliais, pericitos e células inflamatórias por meio de fatores de crescimento e quimiocinas. O depósito elevado de colágeno e a expressão de tenascina induz a modificação da matriz extracelular que, por sua vez, emite sinais oncogênicos. Os fibroblastos modulam a resposta inflamatória secretando quimiocinas e interleucinas como a IL-1. Com a secreção de metaloproteinases (MMPs) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), os FACs promovem a formação de novos vasos. Também estimulam a proliferação, secretando os fatores de crescimento de hepatócitos (HGF) e transformante beta (TGFβ), e a invasão de tecidos, secretando o TGFβ (modificado de Kalluri e Zeisberg, 2006).

Com o objetivo de investigar os mecanismos potenciais pelos quais o microambiente tumoral contribui para o fenótipo neoplásico, um estudo recente de nosso grupo avaliou fatores parácrinos produzidos por fibroblastos e células neoplásicas de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e que poderiam influenciar a proliferação e a expressão gênica (Rodrigues-Lisoni, Peitl *et al.*, 2010). Os resultados compreenderam uma lista de genes e algumas proteínas potencialmente relacionadas com a indução de alterações imunes e inflamatórias. Esses fatores e suas vias de sinalização foram foco de investigação no presente trabalho, em especial aqueles que se mostraram também alterados em bibliotecas SAGE (*Serial Analysis Of Gene Expression*) desses tumores, em outro estudo do mesmo grupo (Silveira, Varuzza *et al.*, 2008).

Alguns dados epidemiológicos sobre o câncer

O câncer é resultado da ação de fatores ambientais externos e de fatores responsáveis pela suscetibilidade individual, os primeiros geralmente desempenhando papel etiológico central e os fatores hereditários um papel secundário (Filho Mt e S, 2006). É ocasionado pelo acúmulo de um conjunto de mutações em uma única célula, muitas das quais alteram os mecanismos básicos de controle de proliferação ou de morte celular.

É uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. No Brasil, está entre as três primeiras causas de morte, juntamente com doenças do aparelho circulatório e respiratório. Com o aumento da expectativa de vida, sua prevalência provavelmente aumentará (Ministério; Kulasingam e Diamandis, 2008) uma situação que caracteriza essa doença como um problema de saúde pública e justifica a mobilização em torno de uma estratégia para prevenção, controle e assistência aos pacientes (Ramos, Coin De Carvalho *et al.*, 2007).

O perfil de incidência mostra que os tipos mais freqüentes de câncer no Brasil, como em outros países, são os de próstata no sexo masculino e os de mama no sexo feminino, excetuando-se os de câncer de pele não-melanona, que apresentam os índices mais elevados (Ministério da Saúde, 2010). Outros tumores são também muito freqüentes na população brasileira e devem refletir a atuação de fatores ambientais e de estilo de vida. Entre eles estão os de vias aéreas superiores e intestino, e os de colo de útero entre as mulheres.

Entre as neoplasias de vias aéreas superiores, está o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, que representa o sexto tipo mais freqüente de câncer no mundo e atinge sítios anatômicos próximos que incluem cavidade nasal, faringe e laringe (Leon Barnes, John W. Eveson *et al.*, 2005; Chang, Teng *et al.*, 2008). Há uma forte

associação desse grupo de carcinomas bem como os do trato digestivo superior com o abuso de fumo e álcool (Leon Barnes, John W. Eveson *et al.*, 2005). Entretanto, os mecanismos exatos pelos quais os componentes carcinogênicos do tabaco e do álcool induzem transformação e progressão maligna nas células epiteliais não são completamente entendidos.

Apesar da lenta diminuição nas taxas de incidência (~4% desde 1980) e uma modesta melhora na sobrevida em 5 anos (54,4% para 59,4% nos últimos 20 anos), o carcinoma de cabeça e pescoço continua a ser um desafio clínico (Weber, Xu *et al.*, 2007). Infelizmente, a maioria dos casos é diagnosticada em estágios avançados da doença (60% nos estágios III e IV), podendo variar consideravelmente em agressividade, potencial de produção de metástases e sensibilidade à radioterapia e à quimioterapia (Herchenhorn e Dias, 2004).

Mesmo com a utilização de opções terapêuticas como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, 50% dos pacientes acometidos pela doença morrem. Em especial, nos casos diagnosticados com doença avançada ou com recidiva, o câncer de cabeça e pescoço é quase sempre fatal, com uma sobrevida média de aproximadamente seis meses (Soulieres, Senzer *et al.*, 2004; Weber, Xu *et al.*, 2007). Mesmo a combinação de diferentes tratamentos, que geralmente são agressivos e diminuem a qualidade de vida do paciente, a cura raramente é atingida nos casos avançados (Franzi e Silva, 2003). Os procedimentos cirúrgicos geralmente são invasivos e podem causar lesões estéticas irreversíveis, com um significativo comprometimento funcional (perda da voz, movimentos dos ombros limitados, perda do sentido olfativo, do paladar e da capacidade de engolir líquidos) (Barbosa, Santos *et al.*, 2004).

As limitadas opções terapêuticas para estágios avançados do câncer de cabeça e pescoço tornam necessária a melhoria no entendimento das bases moleculares relacionadas ao seu início, progressão e disseminação. A maior parte dos estudos realizados nos últimos anos focou a célula neoplásica propriamente dita, enquanto a contribuição do microambiente para a tumorigênese foi deixada de lado. Apenas recentemente seu papel nesse processo começou a ser mais investigado e, por esse motivo, ainda não é completamente compreendido (Leemans, Braakhuis *et al.*, 2011).

OBJETIVOS

Considerando os dados da literatura e aqueles obtidos previamente por nosso grupo, o presente projeto teve como objetivo geral analisar a expressão de 19 genes que atuam no microambiente tumoral em células neoplásicas e estromais de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Os objetivos específicos do presente projeto compreenderam:

- a) Estabelecer o processo de microdissecção a laser em amostras de carcinomas primários de cabeça e pescoço para seleção de componentes do microambiente tumoral.
- b) Com a utilização do método de PCR quantitativa, analisar o padrão de expressão dos genes *BST2*, *IL1F5*, *LYZ*, *MGLL* e *SERPINA3* em linhagens celulares de células neoplásicas e estromais procedentes de carcinomas primários de cabeça e pescoço.
- c) Com a utilização do método de PCR quantitativa, analisar o padrão de expressão dos genes *BST2*, *COX2*, *CTSB*, *EP3*, *EP4*, *FOSL1*, *GPNMB*, *IL1F5*, *LTA4H*, *LYZ*, *MGLL*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP9*, *S100A6*, *SERPINA3*, *TIMP1*, *TIMP2* e *TPT1* em carcinomas primários de cabeça e pescoço macrodissecados e microdissecados, comparando-o com o de células normais correspondentes.
- d) Com a utilização do método de PCR quantitativa, comparar o padrão de expressão dos genes *BST2*, *COX2*, *CTSB*, *EP3*, *EP4*, *FOSL1*, *GPNMB*, *IL1F5*, *LTA4H*, *LYZ*, *MGLL*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP9*, *S100A6*, *SERPINA3*, *TIMP1*, *TIMP2* e *TPT1* em carcinomas primários de cabeça e pescoço de dois sítios anatômicos, língua e soalho de boca, bem como de tumores com e sem comprometimento de linfonodos com células neoplásicas.

Materiais e Métodos

Materiais

1. Linhagens celulares de cabeça e pescoço

No presente estudo, foi analisada a linhagem celular SCC-9 procedente de um carcinoma epidermóide de língua (American Type Culture Collection / ATCC, E.U.A - CRL-1629) e a linhagem de fibroblastos T7 (desenvolvida pela Profa. Dra. Flávia C. Rodrigues-Lisoni na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP), proveniente de um carcinoma epidermóide primário de área retromolar. As características gerais dessas células estão apresentadas na Tabela 1. As características dos fibroblastos T7 também estão apresentadas no trabalho publicado pelo nosso grupo (Rodrigues-Lisoni, Peitl *et al.*, 2010).

Tabela 1. Características das linhagens utilizadas e dados dos pacientes.

Linhagem	Características	Dados dos pacientes	
		Idade (anos)	sexo
SCC-9	linhagem tumoral (ATCC: CRL-1629) proveniente de carcinoma epidermóide de língua	25	masculino
T7	linhagem de fibroblastos humanos provenientes de carcinoma epidermóide de área retromolar	49	masculino

2. Amostras de queratinócitos e fibroblastos normais de cavidade oral

Como controles para os experimentos realizados, foram utilizados queratinócitos humanos de mucosa oral normal BHK e fibroblastos humanos normais de cavidade oral. Os primeiros foram gentilmente cedidos pela Dra. Mônica Beatriz Mathor Instituto de Pesquisas Energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo (IPEN/USP, São Paulo/SP) e obtidos durante o projeto de mestrado de sua aluna Maria Fátima Guarizo Klingbeil. Essas células foram recebidas na forma de *pellets* de cultivo, congelados em meio com DMSO (dimetil-sulfóxido). Os fibroblastos foram cedidos por Lucas Offenbecker Guerra, diretor de pesquisa do Grupo Investiga (LTDA), Campinas/SP.

3. Amostras de carcinomas epidermóides primários de cabeça e pescoço

Foram analisadas amostras de tumores e suas respectivas margens cirúrgicas procedentes de 40 carcinomas epidermóides de cavidade oral (CECPs), que foram classificados de acordo com o sistema TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) da *Union*

Internationale Contre le Cancer – UICC (<http://www.uicc.org/>) utilizando critérios clínicos e patológicos. Esse sistema descreve a extensão da doença com base na avaliação de três componentes: extensão do tumor (T), ausência (0), presença (+) e extensão de metástase em linfonodos regionais (N) e ausência ou presença de metástase à distância (M).

As amostras foram obtidas de 22 tumores de língua (12 N0, 9 N+ e 1 com dado não disponível) e 18 tumores de soalho de boca (9 N0 e 9 N+), ambos portanto de cavidade oral, definidos segundo o Código Internacional de Doenças (CID) como sendo C02 e C04 (neoplasias malignas de outras partes e de partes não especificadas da língua e neoplasias malignas de soalho de boca, respectivamente).

Tais amostras foram coletadas após ressecção cirúrgica pelas equipes de médicos do Hospital Heliópolis, SP, do Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho, SP, dos Hospitais das Clínicas, USP, SP e Ribeirão Preto e de hospitais de São José dos Campos, SP, que fizeram parte do Projeto Temático FAPESP 04/12054-9 “Busca de marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço” (Parecer CONEP nº 1763/05 - Processo 25000.152864/2005-50, Registrado sob no. 12380/CONEP. Data 18/095/2005). Imediatamente após a coleta, as amostras foram banhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C até o transporte para o Laboratório de Marcadores Moleculares da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP, onde foram armazenadas em nitrogênio líquido ou freezer -80°C até a sua utilização.

Os dados sobre idade, sexo, exposição a fumo e álcool, sítio primário do carcinoma e TNM de todos os casos analisados estão representados na Tabela 2.

Métodos

1. Cultivo celular

A linhagem celular SCC-9 foi cultivada em frascos de 75cm² contendo 8mL de meio mínimo essencial Eagle - (E)MEM (Cutilab, Campinas, SP) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cutilab), aminoácidos não essenciais 10mM (Gibco, Carlsbad, CA, USA), piruvato de sódio 1mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e solução de antibiótico/antimicótico 0,1%(Sigma-Aldrich). Os fibroblastos humanos normais e a linhagem de fibroblastos tumorais (T7) foram cultivados em frascos de 75cm² contendo meio Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM (Cutilab) suplementado com 10% de SFB (Cutilab), aminoácidos não essenciais 10mM (Gibco), L-glutamina 2mM (Gibco), e solução de antibiótico/antimicótico 0,1% (Sigma-Aldrich). As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de dióxido de carbono (CO₂).

Tabela 2. Características clinicopatológicas de 40 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. ND = não disponível.

Caso	Sexo	Idade	Tabagista	Etilista	Sítio	TNM
281294*	M	60	Sim	Não	Língua	ND
287806*	M	46	Sim	Sim	Soalho de boca	T2N2bM0
297562*	M	67	ND	ND	Soalho de boca	T4N0M
301552*	M	83	Sim	Sim	Língua	T2N0M
CP1/0017	M	55	Sim	No passado	Língua	T2N0M0
CP1/0020	M	37	Sim	Sim	Língua	T4N2BM0
CP1/0040*	M	48	Sim	Sim	Língua	T4N0M0
CP1/0151	M	47	Sim	Sim	Língua	T3N0M0
CP1/0200	M	55	Sim	Sim	Língua	T3N0M0
CP1/0261	M	53	Sim	Sim	Língua	T4N1M0
CP1/0280	M	45	Sim	Sim	Língua	T3N2BM0
CP1/0291	M	55	Sim	Sim	Língua	T4N0M0
CP1/0376	M	56	No passado	No passado	Língua	T4N2cM0
CP1/0398*	M	69	No passado	No passado	Língua	T4N0M0
CP2/0120	F	41	No passado	Nunca	Língua	T2N1M0
CP2/1002	M	59	Sim	Sim	Língua	T2N2cM0
CP2/1022	M	44	Sim	Sim	Língua	T3N0M0
CP2/1036	M	57	Sim	Sim	Língua	T4N1M0
CP3/0050	F	44	Sim	No passado	Língua	TN3M
CP3/0055	M	71	No passado	Sim	Língua	T2N0M0
CP3/0056	M	70	Sim	Sim	Língua	T1N0M0
CP3/0087	M	52	Sim	Sim	Língua	T2N2cM0
CP3/0219	F	71	No passado	No passado	Língua	T1N0M0
CP3/0486	M	56	Sim	Sim	Língua	T3N0M
CP1/0086	M	61	Sim	Sim	Soalho de boca	T1N0M0
CP1/0134	M	51	Sim	Sim	Soalho de boca	T4N1M0
CP1/0248	M	50	Sim	Sim	Soalho de boca	T4N0M0
CP1/0258	M	46	Sim	Sim	Soalho de boca	T1N2BM0
CP1/0346	M	54	Sim	Sim	Soalho de boca	T4N2bM0
CP2/0024	M	42	Sim	Sim	Soalho de boca	T4N0M0
CP2/0051	M	46	Sim	Sim	Soalho de boca	T2N2bM0
CP2/0109	M	63	Sim	Sim	Soalho de boca	T3N0M0
CP3/0033	M	51	Sim	No passado	Soalho de boca	T3N0M0
CP3/0082	M	59	Sim	Sim	Soalho de boca	T4N1M0
CP3/0192	M	51	Sim	Sim	Soalho de boca	T2N0M0
CP3/0280	M	52	Sim	Sim	Soalho de boca	T1N2bM
CP3/0361	M	70	No passado	No passado	Soalho de boca	T2N0M
CP3/0432	F	57	Sim	Sim	Soalho de boca	T1N0M
CP3/0455	M	59	No passado	Sim	Soalho de boca	T3N2bM
CP3/0468	M	51	Sim	No passado	Soalho de boca	T2N2bM

*Casos submetidos a procedimentos de microdissecção a laser. Os demais foram macrodissecados.

O crescimento e a morfologia celular foram monitorados a cada 24h em microscópio invertido e os meios de cultura dos frascos foram trocados a cada três dias. Ao atingirem uma subconfluência de cerca de 70%, as células foram subcultivadas em outros frascos. Para o subcultivo, o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com 5mL de solução tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio pH 7,2 (PBS). Esse meio de lavagem foi aspirado e as células foram tripsinizadas com a adição de 2mL de solução de tripsina 0,05% - EDTA 0,02% e incubadas a 37°C por 2min para que a tripsina pudesse agir e induzir o descolamento das células. Após esse período, os frascos foram examinados ao microscópio para averiguar se as células estavam soltas e, caso ainda estivessem aderidas, foram deixados por mais um minuto na estufa. Em seguida, a tripsina foi inativada com a adição de 3mL de meio MEM ou DMEM (dependendo da linhagem celular) com 10% de soro fetal bovino. O material foi aspirado e dividido em dois tubos de ensaio, que foram centrifugados a 1500rpm por 5 min. O *pellet* com células foi ressuspensionado em 1mL de meio e recultivado. Periodicamente, um dos *pellets* foi ressuspensionado em SFB e solução de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) 9:1 e congelado para manutenção do estoque de linhagens.

Para avaliação do número de células a serem semeadas na fase de recultivo, foi utilizado o contador automático *Countess® Cell Counter* (Invitrogen, Foster City, CA, USA). Uma alíquota de 5µL de meio contendo as células tripsinizadas foi adicionado a um tubo *ependorf* com 5µL de azul de tripano (Sigma-Aldrich) e os 10µL totais foram aplicados em lâmina própria para contagem. O aparelho utiliza um algoritmo para análise de imagens e para cálculo do número de células vivas e mortas. As primeiras brilham devido à ausência do corante em seu interior, pois a membrana celular íntegra impede sua entrada. As células mortas, ao contrário, ficam opacas por causa da presença do azul de tripano em seu citoplasma, uma vez que a membrana celular não é mais seletiva. O número de células viáveis/mL identificadas pelo aparelho foi utilizado para calcular o volume de meio com células a ser semeado.

Para obtenção de réplicas, as células foram semeadas com densidade de 1×10^6 e cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Após sua adesão ao frasco, o meio de cultura foi trocado por meio sem soro para facilitar a sincronização do ciclo celular. As células foram mantidas nesse meio por 24 horas, tempo suficiente para que ingressassem na fase G₀. Após esse período, o meio foi substituído por meio completo e as células foram mantidas em cultivo por 72h, quando foi realizado o bloqueio da cultura com solução de tripsina/EDTA. Uma das réplicas foi encaminhada para extração direta de proteínas e a outra para extração de RNA, DNA e proteínas.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em fluxo laminar bidirecional, específico para esse fim, para manutenção da esterilidade dos materiais bem como para evitar a contaminação das culturas.

2. Preparo das lâminas para microdissecção a laser

As amostras congeladas (mantidas em gelo seco ou nitrogênio líquido) foram transferidas para um disco de metal também mantido a temperaturas próximas a -20°C e cobertas com gel *Tissue Tek*[®] (Zakura Finetek, Europe, Zoeterwoude, The Netherlands), em quantidade suficiente para cobrir todo o material.

Os discos de metal foram encaixados no criostato e, mantendo a temperatura a -24°C na área de trabalho, as amostras foram cortadas em finas seções de $5\text{-}7\mu\text{m}$ de espessura e colocadas em lâminas de vidro convencionais.

Para seleção dos casos a serem microdissecados a laser, uma lâmina de cada amostra foi corada com azul de toluidina e visualizada ao microscópio óptico. Após avaliação do tecido e de sua qualidade, foram selecionadas amostras tumorais e amostras de margem cirúrgica de seis casos.

Imediatamente após sua confecção, as lâminas foram armazenadas em tubos próprios, hermeticamente fechados para evitar excesso de condensação da umidade durante o descongelamento, e mantidas em gelo seco até a finalização dos cortes.

Para cada amostra, foram preparadas seis lâminas, três com tumor e três com margem cirúrgica, que receberam cortes de $5\mu\text{m}$ de espessura destinados a análises de RNA após a microdissecção. Outras seis lâminas, três com tumor e três com margem cirúrgica, receberam cortes de $7\mu\text{m}$ de espessura destinados a análises posteriores de proteína. Os tubos com as lâminas foram armazenados em freezer -80°C por um ou dois dias e, em seguida, transportados em gelo seco para o laboratório onde foram realizadas as microdissecções.

Todos os materiais utilizados no preparo e no armazenamento dos cortes de tecidos, incluindo lâminas de vidro, discos de metal, pincéis, tubos e navalhas, foram previamente lavados com etanol 70%, RNase AWAY (Invitrogen, Forster City, CA, USA) e água tratada com DEPC (Invitrogen) e deixados em câmara de fluxo laminar sob luz ultra-violeta (UV) por 30min. As navalhas e os pincéis foram substituídos a cada troca de amostra. O criostato também foi limpo utilizando o mesmo procedimento, que teve como objetivo a remoção de possíveis contaminantes, bem como a eliminação de RNases que poderiam degradar o RNA.

3. Microdissecção a laser

O procedimento de microdissecção a laser foi realizado sob supervisão do médico Dr. Chin Jia Lin, coordenador do Serviço de Microdissecção a Laser, Rede Multiusuários, da Faculdade de Medicina, USP, SP.

Cinco minutos antes da microdissecção, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina utilizando imersão em hematoxilina de Harris por 30s, água desionizada (2X), etanol 96%, eosina/floxina por 15s, etanol 70% e 96%, etanol 99% por 15s, solução etanol xilol 1:1 e xilol puro (2X). Em seguida, foram rapidamente secas em papel de filtro e deixadas em câmara de fluxo laminar por 5min para melhor secagem e maior desidratação. Todas as soluções foram trocadas a cada amostra, preparadas com água desionizada e com algumas gotas de RNase AWAY.

O aparelho de microdissecção a laser utilizado foi o *PALM® Robot Microbeam* (Carl Zeiss, [Göttingen](http://www.gottingen.de), Germany) (Figura 6). Esse equipamento é composto por um microscópio invertido *Axiovert 200*, uma fonte de raios *laser* (*laser* de nitrogênio UV-A 3 ns), um computador contendo o programa – *Palm Robot software*®, que controla as diversas funções do microscópio e do laser, e uma câmera de vídeo que permite a visualização das seções teciduais na tela do computador.

Figura 6. Aparelho de microdissecção a laser *PALM® Robot Microbeam*. (<http://www.direxlim.fm.usp.br/>).

O princípio do sistema PALM tem como base a combinação de microdissecção a laser com pressão de catapultagem (LMPC). Essa tecnologia utiliza pulsos de laser focalizados na seção tecidual pelas objetivas. Os pulsos atingem e cortam a seção de tecido na sua face inferior em contato com a lâmina, para permitir a separação das células selecionadas. Tais células são identificadas e selecionadas manualmente e o sistema é instruído a catapultar o material por pressão do laser (LPC) por vários milímetros de distância contra a gravidade, em direção a um recipiente coletor que geralmente é a tampa de um tubo *ependorff* (Figura 7). No foco do laser, a energia transferida é suficiente para quebrar as ligações moleculares do material irradiado por um processo chamado “remoção por foto-decomposição”, deixando o material adjacente (fora da área de corte) totalmente intacto. O comprimento de onda utilizado é inferior a qualquer limite absorvido por DNA, RNA e proteínas. Portanto, a amostra não é danificada para análise posterior.

Figura 7. O raio laser é dirigido pelas objetivas para as amostras alvo, catapultando-as de baixo para cima em direção à tampa de um tubo *ependorff* (<http://www.zeiss.de/>)

No presente estudo, o material foi preparado em lâminas de vidro convencionais. Outros estudos utilizam lâminas cobertas com uma fina camada de naftalato (PEN) ou tetraftalato (PET) de polietileno (Carl Zeiss, [Göttingen](#), Germany). Com as lâminas cobertas com PEN ou PET, o laser corta primeiramente sobre a linha que delimita o tecido de interesse e, então, é disparado sobre ele. Nesse segundo disparo, o material é catapultado para o recipiente de coleta, que pode ser preenchido com um tampão de extração ou lise, tais como trizol para análise de DNA e RNA.

Nas lâminas de vidro convencionais, o primeiro laser que corta sobre a linha de delimitação não é necessário e vários pulsos de laser são feitos sobre a área de interesse, catapultado-a em diversos fragmentos e não como pedaço inteiro como é o caso das lâminas cobertas com película.

As áreas das amostras a serem microdissecadas foram desenhadas à mão livre, sendo que, das lâminas contendo tumor, foram separadas células tumorais e de seu estroma adjacente e, das lâminas contendo margem cirúrgica, foram separadas células do epitélio e do tecido conjuntivo normal. A área coletada de cada amostra variou em função da quantidade de cada tipo celular, em uma faixa entre 3.000.000 μm^2 a 10.000.000 μm^2 .

O microscópio utilizado foi montado com objetivas de 5X, 10X, 20X e 40X. A visualização tecidual foi realizada com todos os aumentos, a delimitação da área foi possível com todas as objetivas, mas a função do laser foi possível apenas com as objetivas de 10X, 20X e 40X.

As áreas marcadas foram catapultadas no modo AutoLPC na maioria dos casos com a objetiva de 10X. Esse aumento foi o que mostrou maior eficiência de catapultagem, uma vez que a função do laser não foi possível com a objetiva de 5X e a catapultagem nas objetivas de 20X ou 40X é extremamente demorada.

O recipiente coletor utilizado foi a tampa de um tubo *ependorff* de 0.2 ou 0.5 mL. Essa tampa é revestida por um polímero opaco *AdhesiveCap* (Carl Zeiss), que melhora a visualização da amostra, por causa da cor e do contraste, e também permite a adesão do material sem aplicação de qualquer tipo de solução (Figura 8). Isso minimiza a atividade de nucleases e, em função da imobilização instantânea, não há risco de evaporação e formação de cristais, como pode ocorrer quando é utilizado algum tampão durante um processo de microdissecção demorado.

Figura 8. Tubos com tampa revestida com *AdhesiveCap*. (<http://www.zeiss.de/>)

4. Extração seqüencial de RNA, DNA e proteínas de linhagens celulares e de tecidos normais

O RNA, o DNA e as proteínas das linhagens celulares SCC-9 e T7 e de queratinócitos e fibroblastos normais foram extraídos com o método do trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), segundo protocolo já estabelecido no laboratório (Sambrook e Russel, 2001).

No caso das linhagens celulares, o meio das placas de cultura foi retirado e as células foram lavadas com 5mL de PBS. O PBS foi aspirado e, de forma similar a todos os tipos de amostras, foram adicionados 3 mL de trizol, uma solução monofásica de fenol e tiocianato de guanidina que mantém a integridade do RNA enquanto promove a lise celular. O material foi, então, distribuído em três tubos de 1,5mL e mantido à temperatura ambiente por 5min. Foram adicionados 200µL de clorofórmio gelado para cada mL de amostra em trizol, os tubos foram homogeneizados por 1min e incubados por 10min à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000g, por 10min a 4°C, para separar a fase aquosa, que contém RNA, da interfase branca e leitosa que contém principalmente proteínas, e da fase orgânica, com DNA e proteínas. A fase aquosa com RNA foi transferida para um novo tubo com 500µL de isopropanol gelado e 10µg de glicogênio e mantida por 20min à temperatura ambiente. Após essa etapa de precipitação, as amostras foram centrifugadas a 14.000g por 15min a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O sedimento foi lavado três vezes com 1mL de etanol 70% gelado, agitado até se soltar do tubo e centrifugado a 14.000g por 2min a 4°C. O excesso de etanol foi retirado por pipetagem e os tubos

foram colocados em banho seco a 42°C por um minuto para secagem total do precipitado. O material foi ressuspenso em 20-50µL de água livre de nucleases (dependendo do tamanho do sedimento). As amostras foram colocadas em banho seco a 55°C por 10min para melhor eluição do RNA.

A fase orgânica obtida após a adição de clorofórmio foi submetida ao isolamento de DNA e proteínas. O material recebeu etanol 100% e foi misturado por inversão. A amostra foi incubada por 2-3min a 15-30°C e o DNA foi sedimentado por centrifugação a 2.000g por 5min a 2-8°C. O sobrenadante seguiu o protocolo para extração de proteínas. Para isso, o material recebeu álcool isopropil, foi mantido por 10min à temperatura de 15-30°C e, em seguida, centrifugado a 12.000g por 10min a 2-8°C. O sobrenadante foi removido e o sedimento com proteínas foi lavado três vezes em solução de hidrocloreto de guanidina 0,3M em etanol 95%. Entre cada ciclo de lavagem, o material foi mantido a 15-30°C por 20min e centrifugado a 7.500g por 5min a 2-8°C. O sedimento final foi agitado em 2 mL de etanol, mantido a 15-30°C por 20min e centrifugado a 7500g por 5min a 2-8°C. Em seguida, foi seco em centrífuga a vácuo por 5-10min, dissolvido em SDS 1% (*Sodium Dodecyl Sulfate*) e incubado a 50°C por 16h. O material insolúvel foi sedimentado por centrifugação a 10.000g por 10min a 2-8°C e o sobrenadante ou extrato protéico foi transferido para um tubo novo. O RNA e as proteínas foram posteriormente armazenados a -80°C e o DNA a 4°C.

5. Extração de RNA das amostras de tecidos microdissecados a laser

O RNA da célula tumoral, do estroma tumoral, do epitélio normal e do tecido conjuntivo normal procedentes de tecidos microdissecados a laser foi extraído com o *RNeasy plus micro kit* (Qiagen Sciences, Germantow, MD, USA), seguindo o protocolo do fabricante (Figura 9). O kit é específico para purificações de até 40µg de RNA com eliminação efetiva do DNA genômico. A tampa do tubo utilizada como recipiente de coleta da amostra durante a microdissecção foi lavada com 300µL de tampão RLT Plus. Esse tampão contém isoticianato de guanidina que atua como forte desnaturante e inativa RNases mantendo o RNA intacto. Ao tampão RLT Plus, foi adicionado 3µL de β-mercaptoetanol (β-ME) e o lisado de células foi filtrado em uma coluna denominada *gDNA Eliminator* que remove o DNA genômico. Foi então adicionado etanol à solução com RNA para fornecer condições apropriadas de ligação do RNA à coluna *RNeasy MinElute*, da qual é removido com 14µL de água livre de RNase.

Figura 9. Resumo do procedimento utilizado para extração de RNA com o *RNeasy plus micro kit* (<http://www.qiagen.com/>).

6. Extração direta de proteínas de tecidos microdissecados a laser

As proteínas da célula tumoral, do estroma tumoral, do epitélio normal e do tecido conjuntivo normal, procedentes de tecidos microdissecados a laser foram extraídas com solução de uréia 7M e tiouréia 2M. A tampa do tubo utilizado como receptor da amostra durante a microdissecção foi lavada com 5 μ L dessa solução, tomando-se o cuidado para que todo tecido presente fosse removido. Esse cuidado foi decorrente da pequena quantidade de material e do pequeno volume da solução de lise.

Em função da pequena quantidade obtida, foi confeccionado um *pool* com o produto de extração das seis amostras tumorais, totalizando um volume final de 30 μ L. O mesmo foi realizado para os tecidos do estroma tumoral, do epitélio normal e do

tecido conjuntivo. Como não foi utilizado detergente no tampão de lise celular, o *pool* (30 μ L) foi sonificado por alguns segundos para aumentar a eficiência do tampão. As amostras foram guardadas em freezer -80C até sua utilização em análises por espectrometria de massas.

7. Quantificação e avaliação da integridade do RNA de linhagens celulares

As amostras de RNA provenientes de linhagens celulares foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Nesse equipamento, foi avaliada a pureza do RNA em relação à contaminação com proteínas, pela razão das absorbâncias. A absorbância máxima dos ácidos nucleicos sob luz UV ocorre no comprimento de onda de 260nm e das proteínas no comprimento de onda de 280nm. A razão dos valores de absorbância A260/A280 deve ser ~2 para identificar pureza de RNA. De forma similar, contaminantes químicos como fenol, guanidina e glicogênio, apresentam absorbância no comprimento de onda de 230nm. Por esse motivo, é estabelecido que a razão A260/A230 deve ser de 2 a 2,2 para exclusão de contaminação da solução de RNA por esses compostos.

A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1% pela observação das bandas ribossomais 18S e 28S.

8. Quantificação e avaliação da integridade das proteínas de linhagens celulares

A concentração de proteínas do lisado foi mensurada com o kit *BCATM Protein Assay* (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) em *NanoDrop*. Essa abordagem foi escolhida por causa da compatibilidade dos reagentes utilizados durante a extração de proteínas com os reagentes do kit.

A quantificação pelo método BCA requer a construção de uma curva padrão sempre que for realizada. A curva padrão é feita a partir de diluições de concentrações conhecidas da proteína albumina sérica bovina (BSA) fornecida com o kit. Para a quantificação, o reagente A foi misturado com o reagente B (50A:1B) e 200 μ L dessa mistura foram adicionados a cada um dos poços de uma placa de Elisa, que continham 10 μ L da amostra de proteína a ser quantificada ou de cada uma das diluições de BSA. A placa foi colocada em estufa a 37°C por 30 min e as amostras foram então quantificadas em *NanoDrop*, no comprimento de onda de 562nm (Figura 10). A integridade das proteínas foi posteriormente avaliada em gel de poli-acrilamida.

Figura 10. Resumo das etapas de quantificação de proteínas pelo método BCA (<http://www.piercenet.com/>).

9. Quantificação e avaliação da integridade do RNA e das proteínas das amostras de tecidos microdissecados a laser

A quantificação e a avaliação da integridade do RNA e das proteínas das amostras microdissecadas a laser foram realizadas em *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). Esse sistema utiliza eletroforese capilar em *microchip*, que é feita em versão microfluídica e não ocorre no interior de uma coluna capilar, mas em microcanais fabricados em pequenos blocos. Com esse tipo de eletroforese, é possível separar fragmentos de DNA, RNA e proteínas e posteriormente detectá-los por fluorescência induzida a laser.

No presente trabalho, foram utilizados o *RNA 6000 Pico kit* e o *High Sensitivity Protein 250 Assay kit* (ambos da Agilent Technologies) para RNA e proteínas, respectivamente. Ambos os kits são específicos para amostras com baixas concentrações, da ordem de picogramas. Cada kit é composto por uma matriz de separação, que é uma solução de polímero, uma solução de corante fluorescente e marcadores de tamanho para RNA e proteínas. O chip apresenta poços definidos para cada um desses compostos, bem como para as amostras de interesse (Figura 11).

O corante foi adicionado à matriz antes que ela fosse aplicada em seu poço e esta, por sua vez, foi introduzida nos canais do chip por pressão através de um suporte próprio fornecido com o aparelho. O marcador foi adicionado ao poço adequado do chip e as amostras foram colocadas em sequência. O material foi misturado por vortex e inserido no aparelho.

No *chip* para análises de RNA, podem ser analisadas até 12 amostras e no *chip* para análises de proteínas podem ser analisadas até 10 amostras.

Figura 11. Fotos de (A) chip do kit *RNA 6000 Pico* completo e (B) interior do chip mostrando os microcanais. (<http://www.chem.agilent.com/>)

10. Reação em Cadeia da Polimerase pela transcriptase reversa (RT-PCR)

De acordo com o resultado da quantificação no *NanoDrop*, foi preparado um volume de RNA com concentração de 2 μ g. O RNA de amostras não microdissecadas foi tratado com RQ1 *RNase-Free DNase* (Promega, Madison, WI, USA) para eliminação de DNA genômico, em reação com volume final de 25 μ L.

O cDNA (DNA complementar) foi confeccionado pela reação de transcrição reversa com o sistema *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Esse sistema utiliza a enzima transcriptase reversa *MultiScribe* e a inicialização da síntese da molécula complementar por iniciadores aleatórios – *random primers*.

Os volumes e as concentrações dos reagentes utilizados na reação de transcrição reversa foram: 5 μ L de *random primers* 10X, 2 μ L de dNTPs 100mM, 5 μ L de RT buffer 10X, 2,5 μ L de enzima *MultiScribe* 50U/ μ L. Os reagentes foram adicionados nos 25 μ L provenientes do tratamento com DNase. O volume da reação foi completado para 50 μ L com água tratada com DEPC. As condições da reação de RT-PCR foram: 25°C por 10 min, 37°C por 120min, 85°C por 5 min e 4°C ∞ . No final da reação, foram acrescentados 50 μ L de água tratada com DEPC, sendo o volume final igual a 100 μ L e a concentração de cDNA igual a 20ng/ μ L. As amostras foram então armazenadas em freezer -20°C.

11. Amplificação do RNA e síntese de cDNA de tecido microdissecado a laser

As amostras de RNA provenientes de tecidos microdissecados a laser foram amplificadas com o *Quantitect Whole Transcriptome kit* (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA), que é específico para amplificação de RNA extraído com

RNeasy plus micro kit e para análises de PCR em tempo real. Esse sistema utiliza enzimas e tampões para amplificar todo transcriptoma de amostras com pequenas concentrações de RNA (≥ 1 ng). A transcrição reversa é feita pela enzima T-Script que utiliza tanto *primers* oligo-dT quanto *random primers* para iniciar a síntese. O cDNA é amplificado utilizando a tecnologia da DNA polimerase *REPLI-g Midi*.

12. Seleção de genes de interesse

Os genes de interesse foram selecionados a partir dos marcadores potenciais identificados por estudos prévios do grupo utilizando bibliotecas SAGE de CECPs (Silveira, Varuzza *et al.*, 2008) e dados de hibridação subtrativa rápida em células neoplásicas de CECF tratadas com meio condicionado de células estromais e vice-versa (Rodrigues-Lisoni, Peitl *et al.*, 2010). As vias metabólicas desses marcadores potenciais foram avaliadas e alguns genes relacionados a elas também foram escolhidos.

A seleção dos genes foi realizada pelo banco de dados do Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) e seguiu os seguintes parâmetros: (a) atuação no estroma tumoral; (b) envolvimento potencial em processos de diferenciação, proliferação e migração celular e um papel ainda não bem definido na tumorigênese de cabeça e pescoço.

13. Análise de PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi realizada no equipamento *ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System* (Applied Biosystems) com o sistema *TaqMan* (Applied Biosystems) para os genes (*BST2*, *IL1F5*, *LYZ*, *MGLL* e *SERPINA3*) e com o sistema *SYBR Green* (Applied Biosystems) para os demais genes de interesse.

Sistema TaqMan. Esse sistema utiliza sondas marcadas com fluorescência com comprimentos de onda diferentes e, desta forma, permite a amplificação de dois genes (gene de interesse e constitutivo) na mesma reação. Todas as sondas foram desenhadas pela própria empresa. Para a amplificação, foi utilizado o *Taqman Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), que contém todos os reagentes necessários para a reação. A fluorescência é capturada e coletada continuamente para cada amostra, entre 520 e 660 nm, e a intensidade de fluorescência detectada é diretamente proporcional à quantidade de cDNA da amostra. Esses dados são traduzidos por um *software* específico e plotados em um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência versus o número de ciclos. Quanto maior a quantidade de cDNA molde presente no início da reação, menor é o número de ciclos para detecção

de uma intensidade de fluorescência estatisticamente significativa. Esse ponto é definido como limiar ou C_t e ocorre durante a fase exponencial de amplificação. As reações foram feitas em triplicata com um volume final de 10 μ L, que incluiu 5 μ L de *Taqman Universal PCR Master Mix*, 0,5 μ L de sonda específica para determinado gene, 1 μ L de cDNA da amostra a ser analisada na concentração de 10ng/ μ L e 3,5 μ L de água para completar o volume final da reação. Os ciclos foram de 2min a 50°C; 10min a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min.

Sistema SYBR Green. Os iniciadores específicos para cada transcrito (Tabela 3) foram desenhados com a ferramenta *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>) e as reações foram realizadas em volumes de 20 μ L, contendo 10ng de cDNA molde, 1 μ L de iniciadores na concentração 10nM, 10 μ L de *Power Master Mix SYBR GreenTM* (*Applied Biosystems*) e 7 μ L água. O *Power Master Mix SYBR GreenTM* contém todos os componentes para a reação de PCR em tempo real, exceto o molde, os oligonucleotídeos iniciadores e a água. As condições das reações compreenderam uma etapa inicial de 2min a 50°C para a ativação da enzima UNG, seguida de um passo de 10min a 95 °C para inativação da UNG, evitando, dessa forma, que a enzima degradasse os produtos da termociclagem a ser iniciada em seguida, e também para a ativação da enzima *AmpliTaq Gold* (*Applied Biosystems*,). Posteriormente, seguiram-se 40 ciclos de 15s a 95°C e 1min a 60°C para extensão. Foi acrescentado um passo de dissociação que compreende duas etapas de 15s a 95°C, intercaladas por uma etapa de 30s a 60°C. A curva de dissociação tem como objetivo a verificação de ocorrência de *primer dimers*, produtos inespecíficos e de contaminações.

O gene *GAPDH* foi escolhido como normalizador e as comparações foram realizadas segundo o Esquema 1.

Linhagem de carcinoma (SCC-9)	x	Queratinócitos normais (BHK)
Linhagem de fibroblasto tumoral (T7)	x	Fibroblastos normais

Tumor primário	x	Margem cirúrgica
Estroma tumoral	x	Tecido conjuntivo normal

Esquema 1. Comparações de valores de C_t entre pares.

Tabela 3. Iniciadores para 14 transcritos de interesse.

Oligonucleotídeo	Sequência
<i>COX2</i> anti-sense	5' AGAAGGCTTCCCAGCTTTTG 3'
<i>COX2</i> sense	5' ATTCCCTTCCTTCGAAATGC 3'
<i>CTSB</i> anti-sense	5' TAGGGTGTGCCATTCTCCAC 3'
<i>CTSB</i> sense	5' TCGGACTTCCTGCTCTACAAG 3'
<i>EP3</i> anti-sense	5' TCTCCGTGTGTGCTTGCAG 3'
<i>EP3</i> sense	5' AGCTTATGGGGATCATGTGC 3'
<i>EP4</i> anti-sense	5' CCAAACCTGGCTGATATAACTGG 3'
<i>EP4</i> sense	5' CGAGATCCAGATGGTCATCTTAC 3'
<i>FOSL1</i> anti-sense	5' AGCTCTAGGCGCTCCTTCTG 3'
<i>FOSL1</i> sense	5' AGGAACTGACCGACTTCCTG 3'
<i>GPMB</i> anti-sense	5' TGTCTCTGACCATGCTGTC 3'
<i>GPMB</i> sense	5' CCAAAGGAAGATGCCAATG 3'
<i>LTA4H</i> anti-sense	5' CTTGCATTCGCTTTATGTGC 3'
<i>LTA4H</i> sense	5' TTCATTCAATGCCACAGACC 3'
<i>MMP2</i> anti-sense	5' CCGTCAAAGGGGTATCCATC 3'
<i>MMP2</i> sense	5' AAGTCTGGAGCGATGTGACC 3'
<i>MMP3</i> anti-sense	5' TGAAAGAGACCCAGGGAGTG 3'
<i>MMP3</i> sense	5' AGATGCCCACTTTGATGATG 3'
<i>MMP9</i> anti-sense	5' ATTCGACTCTCCACGCATC 3'
<i>MMP9</i> sense	5' TTGTGCTCTTCCCTGGAGAC 3'
<i>S100A6</i> anti-sense	5' TTGTTCCGGTCCAAGTCTTC 3'
<i>S100A6</i> sense	5' ACACCCTGAGCAAGAAGGAG 3'
<i>TIMP1</i> anti-sense	5' TTTTCAGAGCCTTGGAGGAG 3'
<i>TIMP1</i> sense	5' ACTGTTGGCTGTGAGGAATG 3'
<i>TIMP2</i> anti-sense	5' CTATATCCTTCTCAGGCCCTTTG 3'
<i>TIMP2</i> sense	5' AGAAGGAAGTGGACTCTGGAAAC 3'
<i>TPT1</i> anti-sense	5' GAGGCATTTCCACCAATGAG 3'
<i>TPT1</i> sense	5' CTACAAGATCCGGGAGATCG 3'

A fórmula utilizada para avaliação da expressão dos genes foi:

$$\text{Taxa relativa de expressão} = 2^{-(\Delta\text{Ct do gene alvo} - \Delta\text{Ct do calibrador})} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

O ΔCt é obtido pela subtração da média dos Cts do gene alvo pela média dos Cts do gene endógeno.

Foram considerados diferencialmente expressos os transcritos que exibiram expressão relativa ≥ 2.0 ou ≤ -2.0 em relação ao tecido controle, após a transformação dos valores para logaritmo de base 2. Dessa forma, um valor de expressão relativa igual a +1 equivale a um aumento de expressão de 2 vezes, e um valor de -1 equivale a uma diminuição de expressão de 2 vezes.

14. Eletroforese unidimensional

As proteínas provenientes de linhagens celulares, queratinócitos e fibroblastos humanos normais e tumorais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) unidimensional. O gel unidimensional utilizado é constituído por um gel de empacotamento 5% e um gel de resolução 12%. As alíquotas foram desnaturadas a 96°C por 10min e, em seguida, 100ug de cada extrato protéico foram eluídos em tampão (5X *loading buffer* com β -mercaptoetanol) foram aplicados no gel, juntamente com um marcador de peso molecular - *Low Molecular Weight Calibration Kit* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). A eletroforese foi realizada a 150 volts. Terminada a corrida, o gel foi imerso em solução corante de *coomassie blue* 0,05% por 16 horas. O gel foi, então, tratado com solução de etanol 50% e ácido acético 5% para retirada do excesso de corante e sua imagem foi capturada em *scanner* modelo *ImageScanner* (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). Cada linha horizontal do gel (de cerca de 10 a 100kD) foi cortada em 27 fatias de tamanhos aproximadamente iguais. As fatias foram descoradas, desidratadas e digeridas com tripsina.

15. Digestão de proteínas em gel de poliacrilamida

Cada uma das fatias de gel foi colocada em um tubo de 1,5 mL, lavada três vezes com acetonitrila 50% e uma vez em acetonitrila 100% para descoloração e secas em *Speedvac Concentrators* (Thermo Scientific). Para redução das pontes dissulfídicas, foi adicionado ditioneitol (DTT) 10mM, em volume suficiente para cobrir as fatias de gel. Os tubos foram incubados por 45 min a 50°C e, após esse período, o DTT foi removido. Para a alquilação de cisteínas, foi acrescentada iodoacetamida 50mM,

também em volume suficiente para cobrir as fatias de gel. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 1 hora, a iodoacetamida foi removida e as fatias de gel foram lavadas duas vezes com acetonitrila (ACN) 50% e secas em *Speedvac*. Para digestão das proteínas, foram utilizadas 200ng de tripsina por fatia de gel. Os tubos foram incubados por 5min e, em seguida, foi adicionado bicarbonato de amônio 25mM até cobrir os pedaços de gel e os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas. Após esse período, o material foi tratado com uma solução de ácido fórmico 1% e acetonitrila 50% para inativação da tripsina. O sobrenadante foi removido, transferido para um novo tubo e seco em *Speedvac*. O material foi ressuscitado em ácido trifluoracético (TFA) 0,1% para análise das proteínas. Todas as soluções, exceto a de acetonitrila, foram preparadas com bicarbonato de amônio 25mM.

16. Digestão de proteínas em solução

O *pool* de proteínas extraídas dos tecidos microdissecados foi digerido diretamente na solução de extração. Para redução das pontes dissulfídicas, foi adicionado DTT 5mM (concentração final) e os tubos foram incubados por 25 min a 60°C. Para alquilação de cisteínas, foi acrescentada iodoacetamida 14mM (concentração final) e os tubos foram incubados por 30 min à temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado DTT 5mM para ligação da iodoacetamida livre. Para digestão das proteínas, foi utilizada uma solução de tripsina com concentração final de 20ng/μL e os tubos foram incubados a 37°C por 16 horas. Após esse período, foi adicionado ácido fórmico 0,4% para inativação da tripsina. Todas as soluções, exceto a de acetonitrila, foram preparadas com bicarbonato de amônio 25mM.

17. Identificação de proteínas

Os peptídeos da linhagem SCC-9 e de queratinócitos normais (BHK) foram analisados no equipamento *UPLC acoplado ao sistema ElectroSpray Ionization Quadrupole Time of Flight MS/MS (ESI Q-TOF Ultima API; Waters Corporation, Milford, MA, USA)*, no Instituto Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, com apoio da FINEP e da equipe Rede Proteômica do Estado de São Paulo.

Os peptídeos da linhagem de fibroblasto tumoral (T7), de fibroblastos normais e de tecidos microdissecados a laser foram diluídos em TFA 0,1% para ajuste do pH <4 e purificados em ZipTip C18 (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Os ZipTips foram tratados com solução de equilíbrio I contendo ACN 100% e TFA 0,1% e com solução de equilíbrio II TFA 0,1%. A amostra foi passada por ZipTip de 7 a 10 vezes para que os peptídeos aderissem a ele. O ZipTip com os peptídeos aderidos foi lavado com solução de água e TFA 0,1% e com solução de metanol 5% e TFA 0,1%. Os

peptídeos foram eluídos em solução de ACN 100% e TFA 0,1%. Essas amostras foram analisadas no equipamento *UPLC acoplado* ao sistema *ElectroSpray Ionization Quadrupole Time of Flight MS/MS*, na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Alberto Labate.

Para identificação das proteínas, os dados obtidos foram pesquisados no MSDB (*Mass Spectrometry Protein Sequence DataBase*) com o emprego do *software Mascot Distiller* versão 2.2.1.0. Os resultados foram exportados para o programa Scaffold Q + (versão 3.00.5, Proteome Software Inc., Portland, OR, USA). A quantificação relativa das proteínas foi obtida pelo valor quantitativo calculado de acordo com a média do total de contagem de espectros não agrupados dividido pela contagem total de espectros para as 27 corridas.

18. Análise estatística

O programa *GraphPad prism* (*GraphPad Software Inc.*, San Diego – CA, E.U.A.) foi utilizado para confecção dos gráficos e análises estatísticas (Teste t - não pareado). A significância estatística foi definida para os valores de $p \leq 0,05$.

Resultados

1. Casuística

Foram analisadas 40 amostras de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e 40 amostras de suas respectivas margens cirúrgicas, que incluíram 22 casos de tumores de língua C02 (12 N0, 9 N+ e 1 com dado não disponível) e 18 tumores de soalho de boca C04 (9 N0 e 9 N+). Entre os 40 pacientes, 36 eram do sexo masculino e 04 do sexo feminino, com idades variando entre 37 e 83 (média = 55,1 anos); 39 eram fumantes ou foram fumantes no passado; 37 faziam uso abusivo de álcool ou já haviam feito. As classe TNMs tiveram frequências similares (Tabela 4)

Tabela 4. Frequência dos parâmetros sexo, idade, exposição a fumo e álcool, local de ressecção das margens cirúrgicas e classificação das lesões em 40 pacientes portadores de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.

Parâmetros	Grupos	Total de pacientes (%)
Sexo	Masculino	36 (90%)
	Feminino	04 (10%)
Idade*	≥ 40	39 (97,5%)
	< 40	01 (2,5%)
Fumante	Sim	32 (80%)
	No passado	07 (17,5%)
	Não	0
	Não disponível	01 (2,5%)
Etilista	Sim	29 (72,5%)
	No Passado	08 (20%)
	Não	02 (5%)
	Não disponível	01 (2,5%)
Sítio Primário	Língua (C02)	22 (55%)
	Soalho de boca (C04)	18 (45%)
Classificação	T1	06 (15%)
	T2	11 (27,5%)
	T3	08 (20%)
	T4	13 (32,5%)
	Não disponível	02 (5%)
	N0	21 (52,5%)
	N1	05 (12,5%)
	N2	12 (30%)
	N3	01 (2,5%)
	Não disponível	01 (2,5%)
	M0	39 (97,5%)
	M1-X	0
	Não disponível	01 (2,5%)
		40

* Idade média do grupo = 55,1 anos

2. Microdissecção a laser

As células do tumor e do estroma tumoral e as células do epitélio normal e do tecido conjuntivo normal foram separadas por microdissecção (Figura 12). A delimitação das áreas de interesse foi bastante demorada, em virtude da grande área microdissecada, cerca de 3.000.000um² a 10.000.000um². Esse processo foi especialmente lento no caso do tumor, uma vez que as células neoplásicas e as células estromais encontram-se entremeadas (Figura 13).

Outra etapa bastante demorada foi a de catapultagem automática (desencadeada pelo laser), cuja velocidade diminui quanto maior for o aumento da objetiva. Como as áreas foram delimitadas na objetiva de 10 ou 20X, não foi possível a microdissecção na objetiva de 5X, que é a mais rápida. A delimitação da área e a catapultagem do laser devem ser feitas na mesma objetiva, caso contrário todas as áreas selecionadas serão deslocadas, o que ocasiona um desvio da área microdissecada.

O período transcorrido após a lâmina ser corada e o armazenamento do tubo com as células já microdissecadas no freezer -80°C foi de cerca de 4 horas, e não deveria exceder 30min. Por esse motivo, foi realizado um teste para avaliar o rendimento de RNA em um período menor de microdissecção ou, ao contrário, em um período maior que permitiria uma quantidade maior de tecido microdissecado. O resultado mostrou que um período maior de microdissecção era mais vantajoso que a microdissecção de uma pequena área em 30min. De qualquer maneira, uma microdissecção lenta pode afetar a integridade do RNA.

A quantidade de células obtidas de cada tipo celular correspondente à área $\geq$ 200.000um² foi inicialmente satisfatória, mas não foi comprovada para outras amostras. Sendo assim, foi necessário aumentar a área microdissecada para no mínimo 3.000.000 um². Dependendo da disponibilidade do material microdissecado, essa área chegou a 10.000.000um².

3. Extração de RNA e obtenção de cDNA

Linhagens celulares e amostras macrodissecadas

A extração de RNA por trizol e a síntese de cDNA foram realizadas para as linhagens celulares SCC-9, T7, BHK e fibroblastos humanos normais, bem como para as amostras macrodissecadas. A Figura 14 exemplifica o resultado da corrida em gel de agarose para as linhagens celulares.

Figura 12. Fotografias de tecido de margem cirúrgica. A) Tecido da margem cirúrgica antes da microdissecção, a seta vermelha indica as células epiteliais normais e a seta azul indica o tecido conjuntivo normal. B) Delimitação de uma área de tecido conjuntivo normal (marcada em azul) para dissecção. C) Tecido após dissecção das células do tecido conjuntivo normal.

Figura 13. Tecido de carcinoma de língua, as células tumorais e do estroma tumoral encontram-se entremeadas. A) Na objetiva de 5X. Não foi possível marcar as células tumorais e/ou estromais. B) Objetiva de 10X.

Figura 14. Foto de gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio para visualização das duas bandas ribossomais 28S e 18S. Linhagem celular SCC-9 (1), queratinócitos humanos normais (BHK) (2) e fibroblastos humanos normais (3).

Amostras microdissecadas a laser

O RNA de amostras microdissecadas a laser foi extraído com o *RNeasy plus micro kit*. O RNA de uma amostra teste foi quantificado em espectrofotômetro nanodrop, mas o sinal capturado pelo aparelho foi negativo, o que é previsto para amostras pequenas, uma vez que, a concentração mínima identificada pelo aparelho é de 1ng e as amostras microdissecadas geralmente apresentam concentrações em pg. Em função dessa concentração baixa e do pequeno volume (10uL) de RNA disponível, as amostras microdissecadas a laser não foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose, mas em Bioanalyzer por eletroforese em chip, com o *RNA 6000 Pico kit*. O aparelho realiza a quantificação e gera uma representação gráfica do gel para visualização das bandas ribossomais (Figura 15). O número de integridade do RNA (RIN) é estabelecido pela relação dos picos das bandas ribossomais 18S e 28S. Quanto maior o RIN, maior a integridade do RNA. A medida da concentração do RNA é feita com base na área total dos picos de leitura; assim, quanto maior a área de leitura, maior a concentração de RNA (Figura 16).

O RIN obtido para o RNA das amostras microdissecadas a laser variou de 1 a 5,7.

4. Seleção de genes de interesse

Os genes de interesse foram selecionados a partir dos marcadores potenciais identificados por estudos prévios do grupo, cujos resultados foram apresentados nos artigos de Silveira et al. (2008) e Rodrigues-Lisoni, Peitl *et al.* (2010). A lista de candidatos (Tabela 4) incluiu genes envolvidos no processo inflamatório com alteração de expressão em bibliotecas SAGE de CECPs e genes que atuam no estroma tumoral ou estão potencialmente envolvidos em processos de diferenciação, proliferação e migração celular.

Figura 15. Representação gráfica do gel gerado pelo Bionalyzer para visualização das duas bandas ribossomais 18S e 28S. Epitélio normal (1), tecido conjuntivo normal (2), tumor (3) e estroma tumoral (4).

Figura 16. Relação das leituras dos picos de RNA em 18S e 28S.

Tabela 4. Lista de 19 genes de interesse selecionados a partir de marcadores potenciais identificados em bibliotecas SAGE e em estudos que investigaram o papel do microambiente tumoral em CECP, bem como da literatura relacionada, símbolo e nome oficiais, processo biológico e código de evidência.

Símbolo do gene	Nome oficial do gene	Processo biológico*	Código de evidência**
BST2	<i>bone marrow stromal cell antigen 2</i>	ativação de célula B	IEA
		proliferação celular	TAS
		sinalização célula-célula	TAS
		resposta de defesa a vírus	IDA
		resposta imune humoral	TAS
		resposta imune inata	IEA
		desenvolvimento	TAS
		regulação positiva da cascata I-kappaB kinase/NF-kappaB	IMP
		transdução de sinal	IMP
		movimento celular	TAS
COX2 ou PTGS2	<i>prostaglandinendoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)</i>	padrão da ciclooxigenase	IDA
		processo biossintético de ácido graxo	IEA
		processo biossintético de hormônio	TAS
		regulação negativa de transporte de cálcio	IEA
		regulação negativa de proliferação celular	IEA
		regulação positiva de apoptose	IEA
		regulação positiva de apoptose	ISS
		diferenciação	ISS
		regulação positiva de migração	ISS
		regulação positiva de apoptose	ISS
		produção de FGF	ISS
		regulação positiva de apoptose	ISS
		biossíntese de óxido nítrico	ISS
		regulação positiva de produção de PDGF	ISS
		regulação positiva de biossíntese de prostaglandina	NAS
		regulação positiva de produção de TGF	ISS
		regulação positiva de produção de VEGF	ISS
		metabolismo de prostanóide	TAS
		regulação de ciclo celular	IEA
		regulação de resposta inflamatória	NAS
		resposta a estímulo por citocina	IEA
		resposta a droga	IEA
		resposta a estradiol	IEA
		resposta a compostos orgânicos	IEA
		resposta a estresse oxidativo	IEA
		resposta a vitamina D	IEA
		metabolismo de xenobióticos	TAS
CTSB	<i>cathepsin B</i>	autofagia	IEA
		regulação negativa de morte celular	IEA
		proteólise	IDA
		regulação de apoptose	TAS
		regulação de atividade catalítica	IEA

		resposta a estímulo por amina	IEA
		resposta a etanol	IEA
		resposta a estímulo por glicose	IEA
		resposta a interleucina-4	IEA
		resposta a estímulo mecânico	IEA
		resposta a composto orgânico	IEA
		resposta a estímulo por hormônio	IEA
		resposta a estímulo protéico	IEA
		resposta a ferimento	IEA
		desenvolvimento de tecido muscular	IEA
EP3 ou PTGER3	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)	morte celular	TAS
		sinalização por receptor acoplado a proteína G	TAS
		transcrição	TAS
EP4 ou PTGER4	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	sinalização por receptor acoplado a proteína G	TAS
		resposta imune	TAS
		regulação de ossificação	IEA
FOSL1	FOSlike antigen 1	resposta de defesa celular	TAS
		resposta a estímulo extracelular	IEA
		quimiotaxia	TAS
		regulação negativa de proliferação celular	IEA
		regulação positiva de apoptose	IEA
		regulação positiva de ciclo celular	IEA
		regulação positiva de proliferação celular	TAS
		regulação positiva de transcrição	IEA
		regulação da transcrição	TAS
		resposta a cAMP	IEA
		resposta a estímulo por corticosterona	IEA
		resposta a estímulo por citocina	IEA
		resposta a droga	IEA
		resposta a gravidade	IEA
		resposta a peróxido de hidrogênio	IEA
		resposta a estímulo mecânico	IEA
		resposta a composto orgânico	IEA
		resposta a estímulo por progesterona	IEA
		resposta a vírus	TAS
		mineralização óssea	TAS
GPNMB	glycoprotein (transmembrane) nmb	mineralização óssea	IEA
		adesão celular	IEA
		regulação negativa de proliferação celular	TAS
		diferenciação de osteoblasto	IEA
IL1F5	interleukin 1 family, member 5 (delta)	regulação negativa de sinalização mediada por citocina	TAS
LTA4H	leukotriene A4 hydrolase	processo biossintético hormonal	TAS
		resposta inflamatória	NAS
		processo biossintético de leucotrieno	IDA
		processo catabólico de peptídeo	IDA
		processo metabólico de prostanóide	TAS
		proteólise	IEA
		resposta a estímulo por hormônio	IEA
		resposta a zinco	IEA
		diferenciação de pneumócito	IEA
LYZ	lysozyme	processo catabólico	IEA
		citólise	IEA
		resposta de defesa a bactéria	IEA
		resposta inflamatória	TAS

<i>MGLL</i>	<i>monoglyceride lipase</i>	processo catabólico	ISS
		processo metabólico de ácido aracdônico	ISS
		biossíntese de ácidos graxos	IEA
		resposta inflamatória	TAS
		catabolismo de lipídeos	IEA
		metabolismo de lipídeos	TAS
		regulação de sinalização por endocanabinóides	ISS
		regulação de resposta inflamatória	ISS
		regulação de transdução de sinal	ISS
		catabolismo de triglicérides	TAS
<i>MMP2</i>	<i>matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)</i>	angiogênese	IEA
		catabolismo de colágeno	IEA
		processo metabólico	IEA
		proteólise	IEA
<i>MMP3</i>	<i>matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)</i>	resposta à adesão célula-matriz	IEA
		catabolismo de colágeno	IEA
		processo metabólico	IEA
		proteólise	IEA
		resposta a estradiol	IEA
		resposta a hipóxia	IEA
		resposta a interleucina	IEA
		resposta a lipopolissacarídeo	IEA
		resposta a TNF	IEA
		cicatrização	IEA
<i>MMP9</i>	<i>matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)</i>	catabolismo de colágeno	IEA
		organização de ECM	IEA
		diferenciação de macrófago	TAS
		processo metabólico	IEA
		regulação positiva de apoptose	IEA
		regulação positiva de migração de queratinócito	IMP
		proteólise	IDA
		desenvolvimento de sistema ósseo	IEA
<i>S100A6</i>	<i>S100 calcium binding protein A6</i>	axogênese	NAS
		regulação positiva de proliferação de fibroblasto	NAS
		transdução de sinal	TAS
<i>SERPINA3</i>	<i>serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha1 antiproteinase, antitrypsin), member 3</i>	resposta de fase aguda	IEA
		resposta inflamatória	NAS
		manutenção de epitélio	NAS
		regulação negativa de endopeptidase	ISS
		regulação de processo metabólico de lipídeo	NAS
		regulação de proteólise	ISS
<i>TIMP1</i>	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 1</i>	envelhecimento	IEA
		regulação negativa de apoptose	IEA
		regulação negativa de proteólise	IDA
		ativação e desgranulação de plaqueta	TAS
		regulação positiva de proliferação celular	TAS

		resposta a estímulo por citocina	IEA
		resposta a estímulo por hormônio	IEA
		regulação negativa de proliferação celular	IEA
		regulação de processo metabólico	IEA
		regulação de cascata MAPKKK	IEA
		regulação de diferenciação de neurônio	IEA
<i>TIMP2</i>	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 2</i>	regulação negativa de proliferação celular	IEA
		regulação de processo metabólico	IEA
		regulação de cascata MAPKKK	IEA
		regulação de diferenciação de neurônio	IEA
<i>TPT1</i>	<i>tumor protein, translationally controlled 1</i>	anti-apoptose	TAS
		transporte de cálcio	IC
		homeostase de cálcio	IC
		regulação de apoptose	NAS
		resposta a vírus	IEP

*Segundo o banco de dados do Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>).

**Informações disponíveis na literatura utilizadas pelo sistema de anotação do gene. O significado dos códigos está em <http://www.geneontology.org/GO.evidence.shtml>

5. PCR em tempo real

Inicialmente, foram utilizadas sondas *TaqMan* para cinco genes de interesse (*BST2*, *IL1F5*, *LYZ*, *MGLL*, *SERPINA3*), selecionados a partir do trabalho de (Silveira et al. 2008), realizado com dados de bibliotecas SAGE de carcinomas de cabeça e pescoço. Esses genes foram observados com expressão alterada nos tumores e estavam relacionados com inflamação. Posteriormente, outros 14 genes (Tabela 4) foram selecionados por bibliotecas subtrativas rápidas de células de carcinoma de cabeça e pescoço tratadas com meio condicionado por fibroblastos de estroma tumoral e vice-versa (Rodrigues-Lisoni FC et al, 2010). Esses últimos genes e outros de vias de sinalização relacionadas foram escolhidos por seu potencial papel nas interações entre tumor e estroma. Para esses 14 genes, foram desenhados iniciadores e sua expressão foi avaliada pelo sistema *SYBR Green*.

Curva padrão

A eficiência dos iniciadores foi avaliada pela construção de uma curva padrão para os genes de interesse e para gene constitutivo *GAPDH* que foi utilizado como normalizador. Foram empregadas cinco concentrações diferentes de cDNA da linhagem celular SCC-9: amostra pura e suas quatro diluições em série em água DEPC 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4.

Linhagens celulares

Foi observado aumento de expressão dos genes *BST2* e *LYZ* em relação aos controles, tanto nas células tumorais (SCC-9) quanto nos fibroblastos associados a tumor (T7) em relação aos queratinócitos BHK e fibroblastos normais, respectivamente. Os genes *IL1F5* e *MGLL* tiveram sua expressão diminuída para as duas linhagens (Figura 17). Não foi observada expressão do gene *SERPINA3* na linhagem T7 e, nas células SCC-9, foram observados níveis mais baixos de transcritos em relação ao controle.

Figura 17. Expressão dos genes *BST2*, *LYZ*, *IL1F5*, *MGLL* em linhagem T7 em relação a fibroblastos normais (A). Expressão dos genes *BST2*, *LYZ*, *IL1F5*, *MGLL* e *SERPINA-3* em linhagem SCC-9 em relação BHK (B).

Amostras macrodissecadas

A expressão dos 19 genes de interesse foi avaliada primeiramente separando os casos por sítio anatômico (língua ou C02 e soalho de boca ou C04) e posteriormente por comprometimento linfonodal (N0 e N+).

Os genes *EP3* e *MGLL* mostraram redução e o *MMP9* mostrou aumento de expressão em ambos os sítios. Os genes *BST2*, *CTSB*, *FOSL1*, *GPNMB*, *MMP2* e *MMP3* tiveram expressão elevada em tumores de língua e *COX2* e *EP4* expressão reduzida em soalho de boca (Figura 18).

Em relação aos casos agrupados segundo o comprometimento linfonodal, o mesmo perfil foi observado para *EP3*, *MGLL* e *MMP9*, os dois primeiros com níveis reduzidos e o terceiro com níveis elevados tanto em N0 como em N+. Os genes *BST2*, *GPNMB* e *MMP2* tiveram expressão elevada em N0 e *COX2*, *LYZ* e *LTA4H* expressão reduzida em N+ (Figura 19).

Após a análise dos dados pelo Teste t - não pareado, foi observada uma diferença significativa entre tumores de língua e soalho de boca em relação à expressão dos genes *COX2*, *EP4*, *FOSL1*, *MMP3*, *S100A6* e *TIMP1* ($p < 0.05$), mas apenas três deles (*FOSL1*, *MMP3* e *TIMP1*) mostraram níveis mais elevados em relação às amostras normais.

Do mesmo modo, ocorreu diferença significativa na expressão dos genes *BST2* e *GPNMB* ($p < 0.05$) entre os casos N0 e N+, ambos mais expressos em N0 em relação às margens cirúrgicas.

Figura 18. Expressão dos 19 genes de interesse em 34 amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço agrupados nos dois sítios: língua e soalho de boca.

Figura 18. Continuação.

Figura 18. Continuação.

Figura 19. Expressão dos 19 genes de interesse em 34 amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço agrupados em tumores com (N+) e sem (N0) comprometimento linfonodal.

Figura 19. Continuação.

Figura 19. Continuação

Amostras microdissecadas a laser

As amostras microdissecadas a *laser* foram submetidas à amplificação do cDNA com o *QuantiTect Whole Transcriptome kit* (Qiagen) e analisadas em PCR em tempo real. Com base nos valores de Cts dessas amostras foi possível fazer algumas observações. Para os genes *BST2*, *CTSB*, *FOSL1*, *LTAH4*, *S100A6*, *TIMP1*, *TIMP2* e *TPT1*, o perfil de expressão do tumor foi de modo geral paralelo ao do estroma tumoral (Figura 20). Os demais genes exibiram perfis complexos.

Figura 20. Padrão de expressão dos 19 genes de interesse nas seis amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço microdissecadas a laser.

Figura 20. Continuação

6. Eletroforese unidimensional

Linhagens celulares

Foram extraídas proteínas da linhagem celular SCC-9, dos queratinócitos humanos normais, dos fibroblastos humanos tumorais e dos fibroblastos humanos normais cultivados por 72h. Após quantificação pelo método de BCA, um total de 100ug de proteínas foi aplicado em gel de eletroforese unidimensional (Figura 21).

Cada linha do gel 1 e 2 (que vai de cerca de 10 a 100kDa) foi cortada em 27 fatias de tamanho aproximadamente igual. As fatias foram descoradas, desidratadas e digeridas com tripsina.

Cada fatia do gel foi analisada separadamente por espectrometria de massas, com a finalidade de otimizar a caracterização dos componentes da complexa mistura de peptídeos. Proteínas muito abundantes podem mascarar proteínas expressas em menor quantidade. Ao subdividir o gel, a quantidade de proteínas presente em cada parte será muito menor, o que facilita a identificação das proteínas menos abundantes pelo equipamento.

Amostras microdissecadas a laser

As amostras de tecidos microdissecados a laser não foram aplicadas em gel de poliacrilamida, por dois motivos principais: baixa concentração de proteínas, o que torna impossível a visualização das bandas, e pequena quantidade de material obtido (40 uL). A quantificação de proteínas realizada em Bioanalyzer gerou uma representação gráfica de gel (Figura 22), na qual pode ser observada a presença de bandas protéicas. A digestão das proteínas foi realizada diretamente na solução de extração.

7. Espectrometria de massas

Linhagens celulares

Cada fatia do gel de eletroforese unidimensional foi analisada separadamente e gerou diferentes grupos de proteínas, de acordo com o peso molecular. Os dados obtidos foram analisados pelo *software Mascot Distiler*, que utiliza o banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os dados foram exportados para o programa Scaffold, que forneceu uma comparação quantitativa entre células SCC-9 e BHK (Anexo 1) e entre os fibroblastos tumorais e normais (Anexo 2).

Entre 425 proteínas identificadas, um total de 73 estava com expressão $\geq 1,5$ e 290 com expressão $\leq 1,5$ em BHK em relação à SCC-9.

Na comparação de fibroblastos normais com a linhagem T7 de FACs, 49 proteínas estavam com expressão $\geq 1,5$ e 61 com expressão $\leq 1,5$ nos primeiros em relação aos T7, em um total de 126 proteínas identificadas.

Amostras microdissecadas a laser

Na tentativa de identificar proteínas de tecidos microdissecados a laser, todas as seis amostras coletadas do epitélio normal foram utilizadas para confecção de um pool, em um volume final de 40uL (2,8ng de proteína). Procedimento similar foi realizado para as amostras de tecido conjuntivo normal, tumoral e estroma tumoral.

As análises por espectrometria de massas revelaram 22 proteínas no epitélio normal e 7 no estroma normal, 7 no tumor e 10 no estroma tumoral (Anexo 3). Em função do pequeno número de proteínas identificadas, os dados não foram exportados para o programa Scaffold.

Figura 21. Eletroforese em gel de poliacrilamida corado com *coomassie blue* de extrato protéico procedente de linhagem celular SCC-9 (1), queratinócitos humanos normais (2), fibroblatos humanos normais (3) e fibroblastos humanos tumorais T7 (4).

Electrophoresis File Run Summary

Figura 22. Representação gráfica de eletroforese em gel gerada pelo Bioanalyzer, obtida de extrato protéico procedente de tecidos microdissecados a laser. Tecido conjuntivo normal (1), epitélio normal (3), tumor (5) e estroma tumoral (7).

Discussão

A casuística do presente trabalho compreendeu 90% dos pacientes do sexo masculino, 89% fumantes e 72,5% etilistas. Tais frequências são esperadas para esse grupo de neoplasias, tendo sido confirmada em estudos epidemiológicos amplos (Ferlay, Parkin *et al.*; Hashibe, Brennan *et al.*, 2009). A explicação para esse achado é o maior consumo, no sexo masculino, de tabaco e álcool, os dois principais fatores etiológicos da doença.

A idade média observada foi acima de 55 anos, o que também está de acordo com a literatura (Altekruuse *et al.*, 2009), mas idades inferiores também são relatadas especialmente em pacientes positivos para formas oncogênicas do vírus do papiloma humano (HPV). Os sítios anatômicos relacionados com HPV incluem principalmente base de língua, tonsila lingual e orofaringe enquanto aqueles citados como HPV-não relacionados compreendem língua, soalho de boca e outras partes da cavidade oral. Os pacientes HPV positivos possuem um prognóstico melhor quando comparados aos HPV negativos apesar de, no momento do diagnóstico, apresentarem geralmente um comprometimento linfonodal avançado (revisto por Marur, 2010). No presente estudo, a casuística mostrou número similar de classes TNM, mas esse resultado foi fruto da seleção realizada para obtenção de grupos homogêneos.

A técnica de microdissecção a *laser*, embora seja uma importante ferramenta para separação de elementos do microambiente tumoral, resulta na obtenção de pequeno número de células e baixo rendimento em relação à qualidade e à concentração de RNA e proteínas. Além disso, exige vários ciclos de amplificação de RNA para experimentos de PCR em tempo real que pode influenciar os perfis de expressão gênica (De Bruin, Van De Pas *et al.*, 2005). A causa dessa dificuldade é principalmente decorrente do tempo necessário para seleção de áreas apropriadas em cortes histológicos, e para catapultagem de células desencadeada pelo *laser*.

Apesar das dificuldades inerentes à técnica, o resultado obtido no presente trabalho foi satisfatório por que permitiu amplificação dos genes de interesse além dos constitutivos, e também a identificação de proteínas. A utilização de lâminas recobertas com naftalato ou tetraftalato de polietileno permitiria a catapultagem da área total e não de pequenos grupos de células reduzindo muito o tempo e a consequente degradação do material e levando a uma eficiência maior nas etapas posteriores. A substituição da coloração por hematoxilina-eosina utilizada no presente estudo por kits próprios para microdissecção com inibidores de RNase poderia também ter otimizado o processo das extrações de RNA.

Para as análises de expressão gênica, foram selecionados genes com níveis de transcritos alterados em bibliotecas SAGE de carcinomas de cabeça e pescoço metastáticos e não metastáticos e de tecidos normais correspondentes (Silveira, Varuzza *et al.*, 2008). Embora essas amostras não tenham sido microdissecadas porque o objetivo não era o estudo de elementos celulares específicos, foi possível detectar na lista de genes identificados por Silveira e colaboradores vários deles com papel potencial na interação tumor-estroma, entre eles, *BST2*, *IL1F5*, *LYZ*, *MGLL* e *SERPINA3*. Os seus produtos trabalham na resposta imune e inflamatória que é mediada por células abundantes do microambiente tumoral.

O trabalho de (Rodrigues-Lisoni, Peitl *et al.*, 2010) também contribuiu de forma significativa para a seleção de outros 14 genes que poderiam atuar no microambiente tumoral. Sua abordagem envolvendo análise de meio condicionado permitiu a identificação de genes que respondem a fatores parácrinos secretados por células neoplásicas e por fibroblastos do estroma, com um papel na tumorigênese de cabeça e pescoço ainda não bem definido. Entre aqueles com expressão alterada nas células neoplásicas foram observados genes envolvidos em apoptose (*TPT1*), proliferação celular (*GPNMB*), resposta a estímulo (*LTA4H*) e, entre aqueles com expressão alterada nos fibroblastos, estavam genes envolvidos em transdução de sinais (*S100A6*), transcrição e tradução (*FOSL1*), apoptose (*CTSB*, *TPT1*), proliferação celular (*S100A6*, *FOSL1*), resposta a estímulo (*FOSL1*), e metabolismo de proteínas e RNA (*CTSB*).

O gene *BST2* codifica o antígeno 2 da célula estromal de medula que é uma proteína de membrana com atividade antiviral (Kuhl, Sloan *et al.*, 2010.; Neil, Zang *et al.*, 2008) e relacionada com proliferação celular e angiogênese (Wong, Cheung *et al.*, 2007). Sua expressão alterada já foi observada em alguns tipos de câncer, entre eles mieloma (Ohtomo, Sugamata *et al.*, 1999), mama (Becker, Sommer *et al.*, 2005) e cérebro (Wainwright, Balyasnikova *et al.*, 2011). Confirmando o observado por (Silveira, Varuzza *et al.*, 2008) em outro lote de casos, o gene *BST2* mostrou expressão elevada em tumores N0 e no sítio C02 e diferença significativa de níveis de transcritos entre N0 e N+. As amostras microdissecadas revelaram um padrão uniforme, com níveis aparentemente maiores em células neoplásicas, ao contrário dos resultados obtidos nas linhagens SCC-9 e T7. Nessas últimas, os genes *IL1F5* e *SERPINA3* exibiram expressão baixa e, em amostras frescas, não diferiram dos controles normais.

O gene *MGLL* codifica a enzima monoacilglicerol lipase (MAGL) que está associada, além da inflamação, com a transdução de sinais e a biossíntese e o catabolismo de lipídeos. Essas funções destacam-se pelo fato de que a produção de

lipídeos e a regulação da glicólise participam da reprogramação do metabolismo energético que, juntamente com a inflamação, são características importantes da célula neoplásica (Hanahan e Weinberg, 2011).

Além de seu papel como combustível, os lipídeos atuam como mensageiros intracelulares (por exemplo, prostanóides e diacilgliceróis) e na comunicação célula-célula. Esses últimos, após sua síntese, são secretados e ativam diferentes receptores ligados a proteínas G de importantes cascatas de sinalização (revisto por Guzmán, 2010). Existem evidências de que esses mediadores lipídicos estão relacionados com várias doenças humanas, como o câncer. Por exemplo, a prostaglandina E2 (PGE2), um metabólito do ácido aracdônico, e outros lipídeos induzem proliferação celular e migração via receptores (Dorsam e Gutkind, 2007), favorecendo portanto o processo neoplásico. Diferentemente, outros lipídeos derivados do ácido aracdônico, como os endocanabinóides, parecem exercer um efeito contrário (Guzman, 2003). Um deles, o 2-aracdonoglicerol (2-AG), é um mensageiro neuronal importante na funcionalidade de muitas sinapses e é modulado pela MAGL (Dinh, Carpenter *et al.*, 2002).

Há muitos anos, sabe-se que a MAGL participa parcialmente do catabolismo de estoques do triacilglicerol adiposo, o que fornece aos tecidos ácidos graxos livres, um combustível importante em períodos de deprivação de glicose (Tornqvist e Belfrage, 1976). Recentemente, Nomura e colaboradores (2011) observaram que essa enzima controla os níveis de ácidos graxos liberados de estoques da célula neoplásica, o que permite a eles gerar sinais oncogênicos como os da prostaglandina E2. Esses autores também observaram que a expressão de MAGL está consistentemente elevada em células e tumores primários agressivos de ovário, melanoma e mama e que a indução de expressão em células não agressivas aumenta sua patogenicidade, um fenótipo que é revertido pela sua inibição. Por outro lado, o bloqueio da atividade pró-tumor da enzima pode ser liberado por dietas ricas em ácidos graxos livres.

Os dados acima motivam o estudo de membros de cascatas de sinalização geradas por lipídeos e de moduladores de seu metabolismo. No presente trabalho, foram estudados os genes *COX2*, *EP3*, *EP4*, *LTA4H*, *SERPINA3*, além do *MGLL*, todos com participação no metabolismo de lipídeos e com seqüências expressas em tecidos de cabeça e pescoço segundo o banco de dados Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/>).

Ao contrário dos achados de Nomura e colaboradores (2011), a expressão de *MGLL* no presente estudo foi reduzida nas linhagens celulares T7 e SCC-9 e em tumores primários. Os resultados preliminares em amostras microdissecadas reforçaram esse achado.

São raros ainda os dados de expressão dessa enzima em diferentes tipos de câncer. O trabalho de Michalski e colaboradores (2008) mostrou por imunohistoquímica que níveis reduzidos de MAGL foram correlacionados com menor sobrevida em pacientes com câncer pancreático. Ye e colaboradores (2011) obtiveram resultados similares aos de Nomura e colaboradores (2011) para MAGL e observaram que o índice de massa corpórea (IMC) foi o único parâmetro com o qual a expressão elevada dessa proteína estava associada. Os níveis reduzidos de MGLL no presente estudo podem estar relacionados ao sítio anatômico, uma vez que não é encontrado dados na literatura da expressão desse gene em CECp.

Sobre a expressão dos demais genes que atuam no metabolismo de lipídeos, ocorreu geralmente redução de expressão de *COX2*, *EP3*, *EP4* e *LTA4H* nos grupos estudados, embora em amostras microdissecadas os resultados tenham sido heterogêneos exceto para *LTA4H*. É importante ressaltar a diferença significativa de níveis de transcritos de *COX2* e de *EP4* entre tumores de língua e soalho de boca.

O produto de *COX2* é uma enzima provavelmente sintetizada pelas células tumorais e estromais e responsável pela liberação do mediador pró-inflamatório prostaglandina E2, que ativa seus receptores acoplados a proteínas G (EP1-4). Mostra-se com alta expressão em vários tipos de câncer, incluindo, cólon, pulmão e cabeça e pescoço, o que parece ser associado à angiogênese, metástase e proliferação celular. Aparentemente, atua nas fases iniciais da tumorigênese de cabeça e pescoço mas pouco é conhecido sobre o papel dos receptores EPs. Alguns dados da literatura sugerem que a expressão de EP3 possui valor prognóstico (revisto por Abrahao, Castilho *et al*, 2010).

Ao contrário do esperado, os níveis de *COX2* mostraram-se reduzidos nas amostras analisadas. Esses achados podem ser decorrentes da baixa expressão de *MGLL*, responsável por manter níveis elevados de ácidos graxos livres que, por sua vez são principalmente destinados à síntese de mensageiros oncogênicos como a prostaglandina 2 (Guzman, 2010).

Assim, a proposta de Guzmán de que as células neoplásicas devem liberar lipídeos da via do *COX2*, responsáveis pela iniciação de sinais pró-tumor, não encontrou suporte nos dados do presente trabalho. Provavelmente, outros mecanismos devem estar atuando.

A prostaglandina 2 regula a expressão, a secreção e a ativação de várias metaloproteinasas em vários tipos celulares. O modelo proposto por Lee e colaboradores (2011) para explicar os mecanismos celulares e moleculares pelos quais a prostaglandina 2 promove a invasão de células epiteliais e estromais do

endométrio na matriz extracelular inclui a ligação de PGE2 aos receptores EPs, fosforilação e ativação de Src e beta-arrestin, fosforilação e posterior ativação e clivagem de metaloproteinases de membrana (MT-MMP). Uma vez ativadas, as MT-MMPs interagem com pró-MMPs convertendo-as em formas ativas, o que impede a ligação das MMPs aos seus inibidores TIMPs (Lee, Banu *et al*, 2011).

No presente trabalho, ocorreu aumento de expressão de *MMP2*, 3 e 9 em todos os tumores de língua e N0 e apenas o *MMP9* em soalho de boca. Elevação dos níveis de transcritos do inibidor *TIMP1* foi observada apenas em tumores de língua, com diferença significativa em relação aos de soalho de boca. Em amostras microdissecadas, os resultados foram heterogêneos para os genes *MMPs* e mais homogêneos para os *TIMPs*. Os dados sugerem que as metaloproteinases, são ativadas por sinais outros que não os desencadeados pelo *COX2* como proposto por Lee, as metaloproteinases estão atuando nessas amostras para facilitar a degradação de elementos da matriz extracelular e aumentar o poder de invasão.

Outros dois genes também mostraram diferenças significativas de expressão entre N0 e N+ e/ou entre os dois sítios anatômicos: o *FOSL1*, um fator de transcrição que parece regular as metaloproteinases 2 e 9 (Adiseshaiah, Vaz *et al.*, 2008), e o *GPMB*, com evidências de atuar como regulador negativo de respostas inflamatórias de macrófagos (Ripoll, Irvine *et al.*, 2007).

Em conclusão, a maioria dos genes estudados mostrou um padrão similar na comparação de carcinomas de língua e soalho de boca e de casos N0 e N+. Uma concordância de perfil de expressão elevada ou, então, reduzida nesses grupos de amostras foi observada apenas para três genes (*EP3*, *MGLL* e *MMP9*).

O perfil protéico obtido para as células estromais e neoplásicas mostrou uma ampla variedade de proteínas com níveis muito diferentes de expressão, várias delas hipotéticas. Algumas dessas proteínas já foram observadas alteradas em tumores de cabeça e pescoço, entre elas as da família S100A, anexina, *heat shock*, queratina e Ras (He, Chen *et al.*, 2004; Matta, Desouza *et al.*, 2008; Patel, Hood *et al.*, 2008; Ralhan, Desouza *et al.*, 2008). Esses dados permitem prever informações novas sobre a tumorigênese de cabeça e pescoço e merecem novas análises por técnicas de imunomarcacão.

CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas no presente trabalho estão relacionadas a seguir:

1. O protocolo de microdissecção a laser foi estabelecido e permitiu obtenção de RNA passível de análise e proteínas. A técnica, embora seja uma importante ferramenta para separação de elementos do microambiente tumoral, é limitada quanto ao número de células obtidas e ao rendimento em qualidade e concentração de RNA e proteínas. A causa dessa dificuldade é principalmente decorrente do tempo necessário para seleção de áreas apropriadas em cortes histológicos, e para catapultagem de células desencadeada pelo *laser*.
2. Os carcinomas epidermóides primários de língua mostram: redução de expressão dos genes *MGLL* e *EP3*; e aumento de expressão dos genes *BST2*, *FOSL1*, *GPNMB*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* e *TIMP1*.
3. Os carcinomas epidermóides primários de soalho de boca mostram: redução de expressão dos genes *COX2*, *EP3*, *EP4* e *MGLL*; e aumento de expressão do gene *MMP9*.
4. Os carcinomas epidermóides primários sem comprometimento linfonodal mostram: redução de expressão dos genes *MGLL* e *EP3*; e aumento de expressão dos genes *BST2*, *GPNMB*, *MMP2*, *MMP3* e *MMP9*.
5. Os carcinomas epidermóides primários com comprometimento linfonodal mostram: redução de expressão dos genes *COX2*, *EP3* e *MGLL*; e aumento de expressão do gene *MMP9*.
6. O perfil de expressão de genes analisados nos tumores de língua é similar ao de tumores sem comprometimento linfonodal. O mesmo foi concluído para tumores de soalho de boca e com comprometimento linfonodal.
7. Os dados do presente estudo não confirmam em células de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço a proposta de que o gene *MGLL* atua na liberação de mensageiros lipídicos pró-tumor.
8. As metaloproteinases estão potencialmente envolvidas na degradação da matriz extracelular em CECp.
9. As células estromais e neoplásicas de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço mostram uma ampla variedade de proteínas com níveis muito diferentes de expressão.

Resumo

Tem se tornado evidente que a iniciação e a progressão do câncer depende de vários componentes do microambiente tumoral, incluindo células inflamatórias e imunes (linfócitos, macrófagos e mastócitos), fibroblastos, células endoteliais, adipócitos e matriz extracelular. De maneira geral, esses componentes são conhecidos como estroma. Tanto interações pró- como anti-tumor ocorrem entre um câncer e suas células vizinhas. Em um estudo prévio, avaliamos dados de bibliotecas SAGE de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) usando ferramentas estatísticas e de bioinformática e pudemos identificar os genes mais e menos expressos em tumores metastáticos versus não metastáticos e em tumores versus tecidos normais. Em outro estudo, avaliamos fatores parácrinos solúveis produzidos por células do estroma e por células neoplásicas que poderiam influenciar proliferação e expressão gênica e protéica. Ambos os estudos identificaram marcadores potenciais associados a respostas inflamatórias ou imunes. Dezenove desses genes foram selecionados por PCR em tempo real e o estudo foi realizado nas linhagens SCC-9 de células epiteliais neoplásicas e de fibroblastos isolados de um câncer oral, e em 40 amostras de carcinomas primários de cabeça e pescoço (6 amostras micro e 34 macrodissecadas). Nós também utilizamos eletroforese unidimensional para analisar a expressão protéica nesse conjunto de amostras. Como a microdissecção produziu baixas concentrações de RNA e proteínas, ciclos extras de amplificação de mRNA foram necessários para obter material suficiente para experimentos de PCR. Nossos dados mostraram que os perfis de expressão foram provavelmente pouco preservados durante os ciclos extras de amplificação. Em amostras macrodissecadas, nós consistentemente observamos que o nível de transcritos de MGLL, COX2, EP3, EP4 e LTAH4 estava reduzido, porém presente nas suas margens cirúrgicas. Os dados não confirmaram, em células de CECP, a hipótese de que MGLL produz menssageiros lipídicos oncogênicos, esta via pode não atuar nesses pacientes. Nós também observamos que metaloproteinases são expressas em níveis elevados em CECP e devem estar envolvidas na degradação da matriz extracelular. Células neoplásicas e do estroma desses carcinomas exibem uma ampla variedade de proteínas com níveis muito diferentes de expressão. Este resultado abre perspectivas para realização de experimentos de validação.

ABSTRACT

It has become evident that cancer initiation and progression depends on several components of the tumor microenvironment, including inflammatory and immune cells (lymphocytes, macrophages and mastocytes), fibroblasts, endothelial cells, adipocytes, and extracellular matrix. Collectively, these components are known as the stroma. Both pro- and anti-tumor interactions occur between a tumor and its surrounding cells. In a previous study, we evaluated data from SAGE libraries of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) using statistical and bioinformatic tools and we could identify top-up and top-downregulated genes in metastatic versus non-metastatic tumors and in tumors versus normal tissues. In another study, we evaluated soluble paracrine factors produced by stromal and neoplastic cells which may influence proliferation and gene and protein expression. Both studies identified potential markers associated with immune or inflammatory response in head and neck tumorigenesis. Nineteen of these genes were selected for real-time polymerase chain reaction (PCR) and the study was carried out on the epithelial cancer cell line SCC-9 and on fibroblasts isolated from an oral cancer, and in 40 samples from primary HNSCC (6 micro and 34 macrodissected samples). We also used one-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry to analyze protein expression in this set of samples. As microdissection yielded low RNA and protein concentrations, extra rounds of mRNA amplification were necessary to obtain sufficient material for PCR experiments. Our data showed that expression profiles were probably scantily preserved during the extra rounds of amplification. In macrodissected samples, we consistently observed that the level of *MGLL*, *COX2*, *EP3*, *EP4* e *LTAH4* transcripts was low in most tumors but present in their surgical margins. The data do not confirm in HNSCC the hypothesis that *MGLL* produces oncogenic lipid messengers, this pathway may not act in these patients. We also observed that metalloproteinases are overexpressed in HNSCC and should be involved in extracellular matrix degradation. Neoplastic and stromal cells from HNSCC exhibit a wide variety of proteins with very different levels of expression. This result opens the perspective to perform validation experiments.

Referências Bibliográficas

- Adisheshaiah, P., M. Vaz, *et al.* A Fra-1-dependent, matrix metalloproteinase driven EGFR activation promotes human lung epithelial cell motility and invasion. J Cell Physiol, v.216, n.2, Aug, p.405-12. 2008.
- Alderton, G. K. Tumour progression: Disease connections. Nat Rev Cancer, v.10, n.10, Oct, p.663. 2010.
- Allinen, M., R. Beroukhim, *et al.* Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. Cancer Cell, v.6, n.1, Jul, p.17-32. 2004.
- Barbosa, L. N. F., D. A. S. Santos, *et al.* Repercussões psicossociais em pacientes submetidos a laringectomia total por câncer de laringe: um estudo clínico-qualitativo. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia, v.68, n.3, p.45-58. 2004.
- Becker, M., A. Sommer, *et al.* Distinct gene expression patterns in a tamoxifen-sensitive human mammary carcinoma xenograft and its tamoxifen-resistant subline MaCa 3366/TAM. Mol Cancer Ther, v.4, n.1, Jan, p.151-68. 2005.
- Bhowmick, N. A., E. G. Neilson, *et al.* Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. Nature, v.432, n.7015, Nov 18, p.332-7. 2004.
- Carmeliet, P. e R. K. Jain. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature, v.407, n.6801, Sep 14, p.249-57. 2000.
- Chang, P. M., H. W. Teng, *et al.* Methotrexate and leucovorin double-modulated 5-fluorouracil combined with cisplatin (MPFL) in metastatic/recurrent head and neck cancer. J Chin Med Assoc, v.71, n.7, Jul, p.336-41. 2008.
- Czechlinska, M., M. Kowalewska, *et al.* Systemic inflammation as a confounding factor in cancer biomarker discovery and validation. Nat Rev Cancer, v.10, n.1, Jan, p.2-3. 2010.
- Clevers, H. At the crossroads of inflammation and cancer. Cell, v.118, n.6, Sep 17, p.671-4. 2004.
- Coussens, L. M. e Z. Werb. Inflammation and cancer. Nature, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.860-7. 2002.
- Crowe, S. E. Helicobacter infection, chronic inflammation, and the development of malignancy. Curr Opin Gastroenterol, v.21, n.1, Jan, p.32-8. 2005.
- De Bruin, E. C., S. Van De Pas, *et al.* Macrodissection versus microdissection of rectal carcinoma: minor influence of stroma cells to tumor cell gene expression profiles. BMC Genomics, v.6, p.142. 2005.

- De Wever, O., P. Demetter, *et al.* Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. Int J Cancer, v.123, n.10, Nov 15, p.2229-38. 2008.
- Dinh, T. P., D. Carpenter, *et al.* Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.16, Aug 6, p.10819-24. 2002.
- Dorsam, R. T. e J. S. Gutkind. G-protein-coupled receptors and cancer. Nat Rev Cancer, v.7, n.2, Feb, p.79-94. 2007.
- Dvorak, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. N Engl J Med, v.315, n.26, Dec 25, p.1650-9. 1986.
- Erez, N., M. Truitt, *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. Cancer Cell, v.17, n.2, Feb 17, p.135-47. 2010.
- Farrow, B., Y. Sugiyama, *et al.* Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. Ann Surg, v.239, n.6, Jun, p.763-9; discussion 769-71. 2004.
- Ferlay, J., D. M. Parkin, *et al.* Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. Eur J Cancer, v.46, n.4, Mar, p.765-81.
- Filho Mt e K. S. Câncer pleuropulmonar ocupacional. J Bras Pneumol, v.32, n.2, p.78-86. 2006.
- Folkman, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. Curr Mol Med, v.3, n.7, Nov, p.643-51. 2003.
- Franco, O. E., A. K. Shaw, *et al.* Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. Semin Cell Dev Biol, v.21, n.1, Feb, p.33-9. 2010.
- Franzi, S. A. e P. G. Silva. Avaliação da qualidade de vida em pacientes submetidos à quimioterapia ambulatorial no Hospital Heliópolis. Revista Brasileira de Cancerologia, v.49, n.3, p.153-158. 2003.
- Gatenby, R. A. e R. J. Gillies. A microenvironmental model of carcinogenesis. Nat Rev Cancer, v.8, n.1, Jan, p.56-61. 2008.
- Genden, E. M., A. Ferlito, *et al.* Neck disease and distant metastases. Oral Oncol, v.39, n.3, Apr, p.207-12. 2003.
- Greten, F. R., L. Eckmann, *et al.* IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. Cell, v.118, n.3, Aug 6, p.285-96. 2004.
- Guzman, M. Cannabinoids: potential anticancer agents. Nat Rev Cancer, v.3, n.10, Oct, p.745-55. 2003.
- Hanahan, D. e R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. Cell, v.100, n.1, Jan 7, p.57-70. 2000.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, v.144, n.5, Mar 4, p.646-74. 2011.

Hashibe, M., P. Brennan, *et al.* Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.18, n.2, Feb, p.541-50. 2009.

He, Q. Y., J. Chen, *et al.* Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. Proteomics, v.4, n.1, Jan, p.271-8. 2004.

Herchenhorn, D. e F. L. Dias. Advances in radiochemotherapy in the treatment of head and neck cancer. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo, v.59, n.1, Jan, p.39-46. 2004.

Herreros, B., A. Sanchez-Aguilera, *et al.* Lymphoma microenvironment: culprit or innocent? Leukemia, v.22, n.1, Jan, p.49-58. 2008.

Izumi, Y., L. Xu, *et al.* Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. Nature, v.416, n.6878, Mar 21, p.279-80. 2002.

Joyce, J. A. e J. W. Pollard. Microenvironmental regulation of metastasis. Nat Rev Cancer, v.9, n.4, Apr, p.239-52. 2009.

Kalluri, R. e M. Zeisberg. Fibroblasts in cancer. Nat Rev Cancer, v.6, n.5, May, p.392-401. 2006.

Kaur, B., T. P. Cripe, *et al.* "Buy one get one free": armed viruses for the treatment of cancer cells and their microenvironment. Curr Gene Ther, v.9, n.5, Oct, p.341-55. 2009.

Kulasingam, V. e E. P. Diamandis. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. Nat Clin Pract Oncol, v.5, n.10, Oct, p.588-99. 2008.

Kumar, A., N. K. Vishvakarma, *et al.* Anti-neoplastic action of aspirin against a T cell lymphoma involves alteration in tumor microenvironment and regulation of tumor cell survival. Biosci Rep, Jun 21. 2011.

Lee, J., S. K. Banu, *et al.* Selective inhibition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 inhibits invasion of human immortalized endometriotic epithelial and stromal cells through suppression of metalloproteinases. Mol Cell Endocrinol, v.332, n.1-2, Jan 30, p.306-13.

Lee, S., J. H. Kim, *et al.* Activation of the interleukin-32 pro-inflammatory pathway in response to human papillomavirus infection and over-expression of interleukin-32 controls the expression of the human papillomavirus oncogene. Immunology, v.132, n.3, Mar, p.410-20. 2011.

Leemans, C. R., B. J. Braakhuis, *et al.* The molecular biology of head and neck cancer. Nat Rev Cancer, v.11, n.1, Jan, p.9-22. 2011.

- Leon Barnes, John W. Eveson, *et al.* Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. 2005. 1-422
p. (Classification of Tumours)
- Li, H., X. Fan, *et al.* Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. J Cell Biochem, v.101, n.4, Jul 1, p.805-15. 2007.
- Lin, C. Y., C. J. Lin, *et al.* Macrophage activation increases the invasive properties of hepatoma cells by destabilization of the adherens junction. FEBS Lett, v.580, n.13, May 29, p.3042-50. 2006.
- Mantovani, A., P. Allavena, *et al.* Cancer-related inflammation. Nature, v.454, n.7203, Jul 24, p.436-44. 2008.
- Matta, A., L. V. Desouza, *et al.* Prognostic significance of head-and-neck cancer biomarkers previously discovered and identified using iTRAQ-labeling and multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Proteome Res, v.7, n.5, May, p.2078-87. 2008.
- Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature, v.454, n.7203, Jul 24, p.428-35. 2008.
- Michalski, C. W., F. E. Oti, *et al.* Cannabinoids in pancreatic cancer: correlation with survival and pain. Int J Cancer, v.122, n.4, Feb 15, p.742-50. 2008.
- Micke, P. e A. Ostman. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? Lung Cancer, v.45 Suppl 2, Aug, p.S163-75. 2004.
- Ministério, D. S. Indicadores e dados básicos para a saúde no Brasil. R.-R. I. D. I. P. A. Saúde. 2007.
- Mueller, M. M. e N. E. Fusenig. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. Nat Rev Cancer, v.4, n.11, Nov, p.839-49. 2004.
- Nomura, D. K., J. Z. Long, *et al.* Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. Cell, v.140, n.1, Jan 8, p.49-61.
- Nurmenniemi, S., T. Sinikumpu, *et al.* A novel organotypic model mimics the tumor microenvironment. Am J Pathol, v.175, n.3, Sep, p.1281-91. 2009.
- Ohtomo, T., Y. Sugamata, *et al.* Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells. Biochem Biophys Res Commun, v.258, n.3, May 19, p.583-91. 1999.
- Patel, V., B. L. Hood, *et al.* Proteomic analysis of laser-captured paraffin-embedded tissues: a molecular portrait of head and neck cancer progression. Clin Cancer Res, v.14, n.4, Feb 15, p.1002-14. 2008.
- Porta, C., E. Riboldi, *et al.* Mechanisms linking pathogens-associated inflammation and cancer. Cancer Lett, v.305, n.2, Jun 28, p.250-62. 2011.

Powell, D. W., R. C. Mifflin, *et al.* Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. Am J Physiol, v.277, n.2 Pt 1, Aug, p.C183-201. 1999.

Qian, B. Z., J. Li, *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. Nature, v.475, n.7355, Jul 14, p.222-5. 2011.

Ralhan, R., L. V. Desouza, *et al.* Discovery and verification of head-and-neck cancer biomarkers by differential protein expression analysis using iTRAQ labeling, multidimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. Mol Cell Proteomics, v.7, n.6, Jun, p.1162-73. 2008.

Ramos, C., J. E. Coin De Carvalho, *et al.* [Impact and (im)mobilization: a study of cancer prevention campaigns]. Cien Saude Colet, v.12, n.5, Sep-Oct, p.1387-96. 2007.

Ripoll, V. M., K. M. Irvine, *et al.* Gpmb is induced in macrophages by IFN-gamma and lipopolysaccharide and acts as a feedback regulator of proinflammatory responses. J Immunol, v.178, n.10, May 15, p.6557-66. 2007.

Rodrigues-Lisoni, F. C., P. Peitl, Jr., *et al.* Genomics and proteomics approaches to the study of cancer-stroma interactions. BMC Med Genomics, v.3, p.14. 2010.

Ronnov-Jessen, L. e O. W. Petersen. ADP-ribosylation of actins in fibroblasts and myofibroblasts by botulinum C2 toxin: influence on microfilament morphology and migratory behavior. Electrophoresis, v.17, n.11, Nov, p.1776-80. 1996.

Sambrook, J. e D. W. Russel. Molecular Cloning a laboratory manual. New York. 2001

Silveira, N. J., L. Varuzza, *et al.* Searching for molecular markers in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) by statistical and bioinformatic analysis of larynx-derived SAGE libraries. BMC Med Genomics, v.1, p.56. 2008.

Soulieres, D., N. N. Senzer, *et al.* Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. J Clin Oncol, v.22, n.1, Jan 1, p.77-85. 2004.

Tlsty, T. D. e P. W. Hein. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. Curr Opin Genet Dev, v.11, n.1, Feb, p.54-9. 2001.

Tornqvist, H. e P. Belfrage. Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. J Biol Chem, v.251, n.3, Feb 10, p.813-9. 1976.

Weber, F., Y. Xu, *et al.* Microenvironmental genomic alterations and clinicopathological behavior in head and neck squamous cell carcinoma. JAMA, v.297, n.2, Jan 10, p.187-95. 2007.

Wiig, H., O. Tenstad, *et al.* Interstitial fluid: the overlooked component of the tumor microenvironment? Fibrogenesis Tissue Repair, v.3, p.12. 2010.

Wong, Y. F., T. H. Cheung, *et al.* Identification of molecular markers and signaling pathway in endometrial cancer in Hong Kong Chinese women by genome-wide gene expression profiling. Oncogene, v.26, n.13, Mar 22, p.1971-82. 2007.

Ye, L., B. Zhang, *et al.* Monoacylglycerol lipase (MAGL) knockdown inhibits tumor cells growth in colorectal cancer. Cancer Lett, v.307, n.1, Aug 1, p.6-17.

Zalatnai, A. Molecular aspects of stromal-parenchymal interactions in malignant neoplasms. Curr Mol Med, v.6, n.6, Sep, p.685-93. 2006.

Anexo 1. Proteínas identificadas e seus valores quantitativos em queratinócitos normais (BHK) e em linhagem tumoral (SCC-9) segundo análise pelo software Scaffold.

			Valor Quantitativo	Valor Quantitativo
Proteínas Identificadas (425)	Número de Acesso	Fold Change	BHK	SCC9
desmoplakin I [Homo sapiens]	gi 1147813 (+1)	>1.5	99.13	0
type I keratin 16 [Homo sapiens]	gi 1195531 (+1)	>1.5	121.91	0
JUP protein [Homo sapiens], gi 119581166 gb EAW60762.1 junction plakoglobin, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119581167 gb EAW60763.1 junction plakoglobin, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119581168 gb EAW60764.1 junction plakoglobin, isoform CRA_a [Ho	gi 15080189 (+4)	>1.5	30.41	0
keratin type II [Homo sapiens]	gi 908790	>1.5	238.3	0
S100 calcium binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11)), isoform CRA_b [Homo sapiens], gi 119573784 gb EAW53399.1 S100 calcium binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11)), isoform CRA_b	gi 119573783 (+3)	>1.5	23.85	0
epiplakin 1 [Homo sapiens]	gi 119602582 (+3)	>1.5	11.46	0
prohibitin 2 [Homo sapiens], gi 148667334 gb EDK99750.1 prohibitin 2 [Mus musculus]	gi 119609105 (+1)	>1.5	8.24	0
keratin [Homo sapiens]	gi 1200072 (+4)	>1.5	3.58	0
hCG1811249, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119621568 (+14)	>1.5	6.02	0
tripartite motif-containing 29, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119587903 (+4)	>1.5	5.57	0
alpha1(E)-catenin [Homo sapiens]	gi 1172426 (+7)	>1.5	5.8	0
ras-related protein Rab-10 [Mus musculus], gi 61889071 ref NP_059055.2 ras-related protein Rab-10 [Rattus norvegicus], gi 155372291 ref NP_001094758.1 ras-related protein Rab-10 [Bos taurus], gi 197099764 ref NP_001126682.1 ras-related protein Rab-10 [	gi 7710086	>1.5	5.92	0
keratin, type II cytoskeletal 75 [Homo sapiens], gi 239938651 sp O95678.2 K2C75_HUMAN RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 75; AltName: Full=Cytokeratin-75; Short=CK-75; AltName: Full=Keratin-6 hair follicle; Short=hK6hf; AltName: Full=Keratin-75;	gi 153791158 (+3)	>1.5	62.26	0
ITGB4 protein [Homo sapiens]	gi 111600276 (+17)	>1.5	3.72	0
protein S100-A8 [Homo sapiens], gi 114559690 ref XP_001137897.1 PREDICTED: hypothetical protein isoform 2 [Pan troglodytes], gi 114559692 ref XP_001137986.1 PREDICTED: hypothetical protein isoform 3 [Pan troglodytes], gi 114559694 ref XP_001138065.1 PR	gi 21614544 (+2)	>1.5	4.47	0
PKP1 protein [Homo sapiens]	gi 109730327 (+4)	>1.5	3.46	0
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119588487 gb EAW68081.1 hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119588486 (+4)	>1.5	3.92	0
CYB5R1 protein [Homo sapiens], gi 119611857 gb EAW91451.1 cytochrome b5 reductase 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 118341481 (+5)	>1.5	2.94	0

solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119618006 (+6)	>1.5	3.86	0
40S ribosomal protein S20 isoform 1 [Homo sapiens], gi 194376262 dbj BAG62890.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 226246671 (+1)	>1.5	5.39	0
60S ribosomal protein L31 isoform 2 [Homo sapiens], gi 119622234 gb EAX01829.1 ribosomal protein L31, isoform CRA_c [Homo sapiens], gi 221041822 dbj BAH12588.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 148746199 (+6)	>1.5	4.56	0
sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial precursor [Homo sapiens], gi 27151704 sp Q9Y6N5.1 SQRD_HUMAN RecName: Full=Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial; Flags: Precursor, gi 5256830 gb AAD41160.1 AF042284_1 unknown [Homo sapiens], gi 168771	gi 10864011 (+6)	>1.5	2.13	0
small GTP binding protein Rab7 [Homo sapiens]	gi 1174149 (+3)	>1.5	5.92	0
Chain A, Solution Structure Of The Oxidized Microsomal Human Cytochrome B5	gi 158428699 (+6)	>1.5	5.6	0
dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex), isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119587579 gb EAW67175.1 dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex), isoform CRA_a [Homo sap	gi 119587578 (+8)	>1.5	1.59	0
protein S100-A14 [Homo sapiens], gi 20178118 sp Q9HCY8.1 S10AE_HUMAN RecName: Full=Protein S100-A14; AltName: Full=S100 calcium-binding protein A14; Short=S114, gi 20334354 gb AAM19206.1 AF426828_1 S100 calcium binding protein A14 [Homo sapiens], gi 99450	gi 10190712	>1.5	2.98	0
ras-related protein Rab-11B [Rattus norvegicus], gi 78369332 ref NP_001030468.1 ras-related protein Rab-11B [Bos taurus], gi 190358517 ref NP_004209.2 ras-related protein Rab-11B [Homo sapiens], gi 226529709 ref NP_001142168.1 hypothetical protein LOC1	gi 14249144 (+12)	>1.5	5.92	0
hypothetical protein [synthetic construct], gi 117645852 emb CAL38393.1 hypothetical protein [synthetic construct], gi 119593216 gb EAW72810.1 signal sequence receptor, delta (translocon-associated protein delta), isoform CRA_d [Homo sapiens]	gi 117644904 (+2)	>1.5	5.6	0
protein S100-A16 [Homo sapiens], gi 20178113 sp Q96FQ6.1 S10AG_HUMAN RecName: Full=Protein S100-A16; AltName: Full=Aging-associated gene 13 protein; AltName: Full=Protein S100-F; AltName: Full=S100 calcium-binding protein A16, gi 14714785 gb AAH10541.1 S	gi 17933772	>1.5	2.98	0
guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4 [Homo sapiens], gi 55621538 ref XP_516888.1 PREDICTED: guanine nucleotide-binding protein, beta-4 subunit isoform 4 [Pan troglodytes], gi 109043534 ref XP_001108708.1 PREDICTED: guanine nucleotide-bindin	gi 11055998 (+8)	>1.5	2.35	0

glycogen phosphorylase B [Homo sapiens], gi 227307 prf 1701409A glycogen phosphorylase	gi 1172226 (+5)	>1.5	2.06	0
NOP56 protein [Homo sapiens]	gi 118142846 (+8)	>1.5	1.59	0
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9, 39kDa, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119609244 (+4)	>1.5	2.35	0
Similar to ribosomal protein L23 [Homo sapiens]	gi 13097600 (+2)	>1.5	2.69	0
keratin, type I cytoskeletal 13 isoform a [Homo sapiens]	gi 131412225 (+2)	>1.5	5.04	0
vesicle-associated membrane protein 8 [Homo sapiens], gi 197099948 ref NP_001124801.1 vesicle-associated membrane protein 8 [Pongo abelii], gi 109103686 ref XP_001086599.1 PREDICTED: vesicle-associated membrane protein 8 [Macaca mulatta], gi 55976764 sp	gi 14043026 (+2)	>1.5	3.5	0
leukocyte elastase inhibitor [Homo sapiens], gi 266344 sp P30740.1 ILEU_HUMAN RecName: Full=Leukocyte elastase inhibitor; Short=LEI; AltName: Full=Monocyte/neutrophil elastase inhibitor; Short=EI; Short=M/NEI; AltName: Full=Peptidase inhibitor 2; Short=PI	gi 13489087 (+3)	>1.5	0.52	0
RecName: Full=Keratin, type I cytoskeletal 19; AltName: Full=Cytokeratin-19; Short=CK-19; AltName: Full=Keratin-19; Short=K19, gi 386803 gb AAA36044.1 40-kDa keratin protein [Homo sapiens], gi 14043271 gb AAH07628.1 Keratin 19 [Homo sapiens], gi 6065640	gi 90111766 (+1)	>1.5	2.61	0
RecName: Full=Protein S100-A2; AltName: Full=CAN19; AltName: Full=Protein S-100L; AltName: Full=S100 calcium-binding protein A2, gi 77415347 gb AAI05788.1 S100 calcium binding protein A2 [Homo sapiens], gi 94364865 gb AAH02829.3 S100 calcium binding pro	gi 114152869 (+2)	>1.49	1.49	0
Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1 [Homo sapiens]	gi 38382823 (+2)	>1.35	1.35	0
ERLIN2 protein [Homo sapiens]	gi 117938801 (+1)	>1.05	1.05	0
PREDICTED: catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa isoform 6 [Pan troglodytes], gi 114586331 ref XP_001137591.1 PREDICTED: catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa isoform 5 [Pan troglodytes], gi 297286052 ref XP_002802887.1 PRE	gi 114586329 (+12)	>1.03	1.03	0
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 158256136 (+8)	>1.03	1.03	0
KIAA1027 protein [Homo sapiens]	gi 20521736 (+3)	<0.67	0	182.66
protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119607088 (+2)	<0.67	0	50.57
filamin-A isoform 1 [Homo sapiens], gi 57284167 emb CAI43199.1 filamin A, alpha (actin binding protein 280) [Homo sapiens], gi 57284203 emb CAI43227.1 filamin A, alpha (actin binding protein 280) [Homo sapiens], gi 119593152 gb EAW72746.1 filamin A, al	gi 116063573 (+4)	<0.67	0	43.57
Chain A, Crystal Structure Of Human Enolase 1, gi 203282368 pdb 3B97 B Chain B, Crystal Structure Of Human Enolase 1, gi 203282369 pdb 3B97 C Chain C, Crystal Structure Of Human Enolase 1, gi 203282370 pdb 3B97 D Chain D, Crystal Structure Of Human Enolas	gi 203282367 (+2)	<0.67	0	60.96
fibronectin 1, isoform CRA_h [Homo sapiens]	gi 119590943 (+6)	<0.67	0	17.71
pyruvate kinase 3 isoform 1 variant [Homo sapiens]	gi 62897413 (+11)	<0.67	0	21.34

transferrin receptor (p90, CD71), isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119574056 (+2)	<0.67	0	8.22
ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 [Homo sapiens], gi 23510340 ref NP_695012.1 ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 [Homo sapiens], gi 24418865 sp P22314.3 UBA1_HUMAN RecName: Full=Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1; AltName: Ful	gi 23510338 (+1)	<0.67	0	8.21
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 193787540 (+9)	<0.67	0	8.93
glucosidase, alpha; neutral AB, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119594451 (+7)	<0.67	0	7.42
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 14042058 (+7)	<0.67	0	7.62
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa), isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119626277 (+11)	<0.67	0	17.97
elongation factor 2 [Homo sapiens], gi 119172 sp P13639.4 EF2_HUMAN RecName: Full=Elongation factor 2; Short=EF-2, gi 88909610 sp Q5R8Z3.3 EF2_PONAB RecName: Full=Elongation factor 2; Short=EF-2, gi 31106 emb CAA35829.1 elongation factor 2 [Homo sapiens]	gi 4503483	<0.67	0	6.82
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 189065399 (+3)	<0.67	0	6.55
Triosephosphate isomerase 1 [Homo sapiens]	gi 17389815 (+6)	<0.67	0	21.82
Transgelin 2 [Homo sapiens], gi 123982024 gb ABM82841.1 transgelin 2 [synthetic construct], gi 123996849 gb ABM86026.1 transgelin 2 [synthetic construct]	gi 12803567 (+3)	<0.67	0	24.54
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 189054543 (+2)	<0.67	0	5.53
interleukin enhancer-binding factor 2 [Mus musculus], gi 24234747 ref NP_004506.2 interleukin enhancer-binding factor 2 [Homo sapiens], gi 207079937 ref NP_001128737.1 DKFZP469C1132 protein [Pongo abelii], gi 57089135 ref XP_537263.1 PREDICTED: similar	gi 13385872 (+3)	<0.67	0	10.35
KIAA0002 [Homo sapiens]	gi 1136741 (+4)	<0.67	0	6.23
aldolase A, fructose-bisphosphate, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119600342 (+5)	<0.67	0	11.9
tropomyosin beta chain isoform 2 [Homo sapiens], gi 114624375 ref XP_001167124.1 PREDICTED: tropomyosin 2 (beta) isoform 10 [Pan troglodytes], gi 339731 gb AAB59509.1 tropomyosin [Homo sapiens], gi 339952 gb AAA36773.1 fibroblast tropomyosin [Homo sapiens]	gi 47519616	<0.67	0	14.07
ribosomal protein L4, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119598180 (+2)	<0.67	0	4.47
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 194380758 (+4)	<0.67	0	4.83
keratin 9 (epidermolytic palmoplantar keratoderma) [Homo sapiens]	gi 119581148 (+3)	<0.67	0	5.65
EIF3A protein [Homo sapiens]	gi 116283747 (+6)	<0.67	0	4.96
BAT1 protein [Homo sapiens]	gi 114306812 (+5)	<0.67	0	7.7
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 194381290 (+2)	<0.67	0	3.3
ribosomal protein L5, isoform CRA_b [Homo sapiens], gi 193788244 dbj BAG53138.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 119593494 (+3)	<0.67	0	6.89
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 158255716 (+3)	<0.67	0	6.23
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 158254970 (+3)	<0.67	0	4.34
t-complex polypeptide 1 [Homo sapiens]	gi 36796 (+1)	<0.67	0	4.27

lupus La protein [Homo sapiens], gi 55613889 ref XP_515890.1 PREDICTED: hypothetical protein isoform 6 [Pan troglodytes], gi 114581626 ref XP_001138102.1 PREDICTED: hypothetical protein isoform 3 [Pan troglodytes], gi 114581628 ref XP_001138273.1 PREDI	gi 10835067 (+2)	<0.67	0	4.99
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 189053643 (+1)	<0.67	0	3.47
HNRPR protein [Homo sapiens]	gi 111494085 (+3)	<0.67	0	4.41
Chain A, Crystal Structure Of Ape1 From Homo Sapiens In A New Crystal Form Complexed With A Ligand, gi 118138506 pdb 2ISI B Chain B, Crystal Structure Of Ape1 From Homo Sapiens In A New Crystal Form Complexed With A Ligand, gi 118138507 pdb 2ISI C Chain C	gi 118138505 (+21)	<0.67	0	9.44
nucleoprotein TPR [Homo sapiens], gi 215274208 sp P12270.3 TPR_HUMAN RecName: Full=Nucleoprotein TPR, gi 55957278 emb CAI17859.1 translocated promoter region (to activated MET oncogene) [Homo sapiens], gi 55960900 emb CAI13119.1 translocated promoter re	gi 114155142 (+4)	<0.67	0	3.74
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 194379996 (+3)	<0.67	0	4.01
tropomyosin alpha-3 chain isoform 4 [Homo sapiens], gi 73961099 ref XP_865805.1 PREDICTED: similar to tropomyosin 3 isoform 2 isoform 17 [Canis familiaris], gi 109016519 ref XP_001113564.1 PREDICTED: tropomyosin alpha-3 chain-like isoform 18 [Macaca mul	gi 114155144 (+4)	<0.67	0	11.17
tripartite motif-containing 28, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119593011 (+4)	<0.67	0	3.54
hnRNP G protein [Homo sapiens]	gi 3256007 (+2)	<0.67	0	5.08
Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma [Homo sapiens]	gi 15530265 (+3)	<0.67	0	3.89
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 [Homo sapiens], gi 121940728 sp Q1KMD3.1 HNRL2_HUMAN RecName: Full=Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2; AltName: Full=Scaffold-attachment factor A2; Short=SAF-A2, gi 93209534 gb	gi 118601081 (+3)	<0.67	0	3.02
RecName: Full=C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic; Short=C1-THF synthase; Includes: RecName: Full=Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase; Includes: RecName: Full=Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase; Includes: RecName: Full=Formyltetrahydrofola	gi 115206 (+3)	<0.67	0	1.76
FKBP54 [Homo sapiens]	gi 1145816 (+5)	<0.67	0	3.4
PRO2619 [Homo sapiens], gi 119626076 gb EAX05671.1 albumin, isoform CRA_m [Homo sapiens]	gi 11493459 (+26)	<0.67	0	2.89
PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 isoform 3 [Pan troglodytes], gi 119574194 gb EAW53809.1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H), isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 114603797 (+2)	<0.67	0	2.62
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 194382540 (+4)	<0.67	0	2.43

exportin-1 [Homo sapiens], gi 109103008 ref XP_001115485.1 PREDICTED: exportin-1-like isoform 1 [Macaca mulatta], gi 109103010 ref XP_001115610.1 PREDICTED: exportin-1-like isoform 2 [Macaca mulatta], gi 109103012 ref XP_001115623.1 PREDICTED: exportin	gi 4507943 (+2)	<0.67	0	2.96
IQ motif containing GTPase activating protein 1 [Homo sapiens]	gi 141797011 (+2)	<0.67	0	3.42
myosin regulatory light chain 12B [Homo sapiens], gi 21728376 ref NP_075891.1 myosin regulatory light chain 12B [Mus musculus], gi 203097095 ref NP_059039.2 myosin regulatory light chain 12B [Rattus norvegicus], gi 222144324 ref NP_001138416.1 myosin r	gi 15809016 (+3)	<0.67	0	20.02
RuvB-like 1 [Homo sapiens]	gi 197692395 (+3)	<0.67	0	3.07
ATP-dependent RNA helicase DDX1 [Homo sapiens], gi 6919862 sp Q92499.2 DDX1_HUMAN RecName: Full=ATP-dependent RNA helicase DDX1; AltName: Full=DEAD box protein 1; AltName: Full=DEAD box protein retinoblastoma; Short=DBP-RB, gi 3123574 emb CAA49992.1 memb	gi 4826686	<0.67	0	2.73
Chain C, Human Pdna, gi 2914387 pdb 1AXC E Chain E, Human Pdna	gi 2914385 (+2)	<0.67	0	4.83
PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast), isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119610994 (+4)	<0.67	0	2.37
septin-9 isoform c [Homo sapiens]	gi 116256489 (+8)	<0.67	0	2.31
PREDICTED: actin-related protein 3-like isoform 1 [Macaca mulatta], gi 194378716 dbj BAG63523.1 unnamed protein product [Homo sapiens], gi 194379436 dbj BAG63684.1 unnamed protein product [Homo sapiens], gi 221045814 dbj BAH14584.1 unnamed protein prod	gi 297266886 (+2)	<0.67	0	3.11
importin7 [Homo sapiens]	gi 11544639 (+3)	<0.67	0	2.32
nascent polypeptide-associated complex subunit alpha isoform a [Homo sapiens]	gi 163965366 (+2)	<0.67	0	5.56
eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 [Homo sapiens], gi 55640927 ref XP_510016.1 PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa isoform 3 [Pan troglodytes], gi 109083996 ref XP_001105924.1 PREDICTED: eukary	gi 4758256 (+6)	<0.67	0	4.89
26S proteasome subunit p97 [Homo sapiens]	gi 1060888 (+10)	<0.67	0	1.65
valyl-tRNA synthetase [Homo sapiens]	gi 123295742 (+2)	<0.67	0	1.7
serine/arginine-rich splicing factor 7 isoform 2 [Homo sapiens], gi 297265844 ref XP_002799298.1 PREDICTED: splicing factor, arginine/serine-rich 7- like isoform 3 [Macaca mulatta], gi 297667797 ref XP_002812151.1 PREDICTED: splicing factor, arginine/ser	gi 306482694 (+5)	<0.67	0	5.86
PREDICTED: similar to chaperonin-like protein isoform 2 [Pan troglodytes], gi 114613469 ref XP_001159045.1 PREDICTED: similar to chaperonin-like protein isoform 3 [Pan troglodytes], gi 114613471 ref XP_001159095.1 PREDICTED: similar to chaperonin-like p	gi 114613467 (+7)	<0.67	0	2.14
hexokinase 1, isoform CRA_d [Homo sapiens]	gi 119574708 (+13)	<0.67	0	2.34
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 10433597 (+8)	<0.67	0	1.81

PREDICTED: similar to ribosomal protein L13a isoform 5 [Pan troglodytes], gi 114678473 ref XP_001172787.1 PREDICTED: similar to ribosomal protein L13a isoform 7 [Pan troglodytes], gi 114678475 ref XP_001172799.1 PREDICTED: similar to ribosomal protein L	gi 114678471 (+7)	<0.67	0	3.59
Chain A, Crystal Structure Of Human Apo-Eif4aiii, gi 114794620 pdb 2HXY B Chain B, Crystal Structure Of Human Apo-Eif4aiii, gi 114794621 pdb 2HXY C Chain C, Crystal Structure Of Human Apo-Eif4aiii, gi 114794622 pdb 2HXY D Chain D, Crystal Structure Of Hum	gi 114794619 (+7)	<0.67	0	3.89
ribosomal protein L3, isoform CRA_d [Homo sapiens]	gi 119580717 (+6)	<0.67	0	3.11
poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119590191 (+8)	<0.67	0	2.4
DNA-binding protein B [Homo sapiens]	gi 181486 (+1)	<0.67	0	3.11
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 189054911 (+1)	<0.67	0	6.52
Chain A, Human Gmp Synthetase In Complex With Xmp, gi 196049680 pdb 2VXO B Chain B, Human Gmp Synthetase In Complex With Xmp	gi 196049679 (+1)	<0.67	0	2.31
dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119602165 (+7)	<0.67	0	2.37
myristoylated alanine-rich C-kinase substrate [Homo sapiens], gi 76803798 sp P29966.4 MARCS_HUMAN RecName: Full=Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate; Short=MARCKS; AltName: Full=Protein kinase C substrate, 80 kDa protein, light chain; Short=80K-L	gi 153070260 (+2)	<0.67	0	1.64
Chain A, Crystal Structure Of Homo Sapiens Kynureninase	gi 119390002 (+6)	<0.67	0	2.34
6-phosphofructokinase type C [Homo sapiens], gi 1346355 sp Q01813.2 K6PP_HUMAN RecName: Full=6-phosphofructokinase type C; AltName: Full=6-phosphofructokinase, platelet type; AltName: Full=Phosphofructo-1-kinase isozyme C; Short=PFK-C; AltName: Full=Phosp	gi 11321601 (+3)	<0.67	0	1.64
GDP dissociation inhibitor 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119606836 (+4)	<0.67	0	2.34
PREDICTED: LIM and SH3 domain protein 1 isoform 1 [Macaca mulatta]	gi 109114799 (+6)	<0.67	0	4.89
14-3-3 protein beta/alpha [Homo sapiens], gi 197692473 dbj BAG70200.1 14-3-3 protein beta/alpha [Homo sapiens]	gi 197692221 (+2)	<0.67	0	14.42
chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta), isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119620390 (+8)	<0.67	0	2.34
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 193785809 (+2)	<0.67	0	1.74
PREDICTED: U5 snRNP-specific protein, 116 kD isoform 1 [Pan troglodytes], gi 193785178 dbj BAG54331.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 114666744 (+9)	<0.67	0	1.2
FACT complex subunit SPT16 [Homo sapiens], gi 114651875 ref XP_528703.2 PREDICTED: similar to chromatin-specific transcription elongation factor FACT 140 kDa subunit isoform 2 [Pan troglodytes], gi 297694658 ref XP_002824589.1 PREDICTED: FACT complex su	gi 6005757	<0.67	0	1.22
chromosome 20 open reading frame 3, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119630519 (+6)	<0.67	0	1.56

Chain A, Trypsin In Complex With Borate, gi 110590763 pdb 2A32 A Chain A, Trypsin In Complex With Benzene Boronic Acid	gi 110590762 (+8)	<0.67	0	4.89
hCG2043289 [Homo sapiens]	gi 119575627 (+7)	<0.67	0	2.34
phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylaminoimidazole synthetase, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119630230 (+4)	<0.67	0	5.87
p180/ribosome receptor [Homo sapiens]	gi 152949522	<0.67	0	3.78
Chain A, Horf6 A Novel Human Peroxidase Enzyme, gi 3318842 pdb 1PRX B Chain B, Horf6 A Novel Human Peroxidase Enzyme	gi 3318841 (+1)	<0.67	0	4.6
Chain A, Crystal Structure Of Human Peroxiredoxin 4 (Thioredoxin Peroxidase), gi 149243260 pdb 2PN8 B Chain B, Crystal Structure Of Human Peroxiredoxin 4 (Thioredoxin Peroxidase), gi 149243261 pdb 2PN8 C Chain C, Crystal Structure Of Human Peroxiredoxin 4	gi 149243259 (+3)	<0.67	0	3.86
reticulocalbin-1 precursor [Homo sapiens], gi 2493462 sp Q15293.1 RCN1_HUMAN RecName: Full=Reticulocalbin-1; Flags: Precursor, gi 1262329 dbj BAA07670.1 reticulocalbin [Homo sapiens], gi 14603330 gb AAH10120.1 Reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding d	gi 4506455	<0.67	0	3.35
tubulin alpha-1A chain [Mus musculus], gi 11560133 ref NP_071634.1 tubulin alpha-1A chain [Rattus norvegicus], gi 17986283 ref NP_006000.2 tubulin alpha-1A chain [Homo sapiens], gi 148727361 ref NP_001092014.1 tubulin alpha-1A chain [Pan troglodytes],	gi 6755901 (+1)	<0.67	0	15.11
coatamer protein complex, subunit alpha, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119573109 (+2)	<0.67	0	1.91
PREDICTED: RuvB-like 2 isoform 2 [Pan troglodytes], gi 119572814 gb EAW52429.1 RuvB-like 2 (E. coli), isoform CRA_d [Homo sapiens], gi 193786091 dbj BAG51374.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 114678325 (+3)	<0.67	0	2.17
Chain A, Crystal Structure Of The Extracellular Portion Of Hab18gCD147, gi 187609339 pdb 3B5H B Chain B, Crystal Structure Of The Extracellular Portion Of Hab18gCD147, gi 187609340 pdb 3B5H C Chain C, Crystal Structure Of The Extracellular Portion Of Hab1	gi 187609338 (+6)	<0.67	0	2.17
ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119593452 (+5)	<0.67	0	1.16
MEG3 [Homo sapiens]	gi 14248495 (+5)	<0.67	0	1.65
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 10434190 (+6)	<0.67	0	1.8
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 10436768 (+8)	<0.67	0	2.05
Chain A, Nitrated Human Manganese Superoxide Dismutase	gi 110590806 (+28)	<0.67	0	7.25
Chain A, Structure Of U2af65 Variant With Polyrudine Tract	gi 112490659 (+6)	<0.67	0	2.34
KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2), isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119589502 (+4)	<0.67	0	1.64
eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1, isoform CRA_c [Homo sapiens], gi 119598669 gb EAW78263.1 eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1, isoform CRA_c [Homo sapiens], gi 119598672 gb EAW78266.1 eukaryotic translation initiation	gi 119598665 (+15)	<0.67	0	1.78

tubulin, beta 2C, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119608775 (+2)	<0.67	0	10.45
RAN, member RAS oncogene family, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119618923 (+6)	<0.67	0	5.39
adenylate kinase 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119627888 (+6)	<0.67	0	6.18
P1cdc47 [Homo sapiens]	gi 1255617 (+7)	<0.67	0	1.64
Chain A, Crystal Structure Of SetTAF-1beta1NHAT, gi 134104222 pdb 2E50 B Chain B, Crystal Structure Of SetTAF-1beta1NHAT, gi 134104223 pdb 2E50 P Chain P, Crystal Structure Of SetTAF-1beta1NHAT, gi 134104224 pdb 2E50 Q Chain Q, Crystal Structure Of SetTAF	gi 134104221 (+3)	<0.67	0	3.97
Chain A, Crystal Structure Of Human Phosphoglucose IsomeraseNEUROLEUKINAUTOCRINE MOTILITY FACTORMATURATION Factor	gi 14488680 (+6)	<0.67	0	1.84
Chain A, Refined Solution Structure Of Human Profilin I	gi 157833469 (+3)	<0.67	0	8.41
unknown [Homo sapiens]	gi 62630180 (+1)	<0.67	0	1.8
KIAA0264 [Homo sapiens]	gi 1665795	<0.67	0	2.64
capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119615295 (+9)	<0.67	0	2.42
capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2 [Cavia porcellus]	gi 115299258 (+26)	<0.67	0	3.26
clathrin light chain A isoform c [Homo sapiens], gi 297684050 ref XP_002819670.1 PREDICTED: clathrin light chain A-like isoform 1 [Pongo abelii], gi 119578714 gb EAW58310.1 clathrin, light polypeptide (Lca), isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 115527060 (+4)	<0.67	0	2.42
signal recognition particle 68kDa, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119609764 (+4)	<0.67	0	1.15
actin-related protein 2/3 complex subunit 2 [Homo sapiens], gi 23238211 ref NP_690601.1 actin-related protein 2/3 complex subunit 2 [Homo sapiens], gi 197101553 ref NP_001126648.1 actin-related protein 2/3 complex subunit 2 [Pongo abelii], gi 114583271	gi 5031599	<0.67	0	2.42
hCG2016179, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119617241 (+3)	<0.67	0	2.92
ribosomal protein S5, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119592989 (+3)	<0.67	0	7.25
spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin), isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119608212 (+14)	<0.67	0	1.78
RPL14 protein [Homo sapiens], gi 62897783 dbj BAD96831.1 ribosomal protein L14 variant [Homo sapiens]	gi 14424542 (+1)	<0.67	0	5.39
chromodomain helicase DNA binding protein 4, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119609183 (+5)	<0.67	0	1.28
cysteiny1-tRNA synthetase, cytoplasmic isoform b [Homo sapiens], gi 20141641 sp P49589.3 SYCC_HUMAN RecName: Full=Cysteiny1-tRNA synthetase, cytoplasmic; AltName: Full=Cysteine--tRNA ligase; Short=CysRS, gi 9837515 gb AAG00578.1 AF288206_1 cytoplasmic cys	gi 10835051 (+11)	<0.67	0	1.09
glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase isoform b [Homo sapiens], gi 116242483 sp P11413.4 G6PD_HUMAN RecName: Full=Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase; Short=G6PD, gi 16596511 gb AAL27011.1 AF277315_1 glucose-6-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens], gi 1265	gi 108773793 (+12)	<0.67	0	1.23

PREDICTED: protein transport protein Sec23A [Macaca mulatta], gi 114652746 ref XP_001145529.1 PREDICTED: SEC23-related protein A isoform 1 [Pan troglodytes], gi 1296664 emb CAA65774.1 Sec23 protein [Homo sapiens], gi 189053385 dbj BAG35191.1 unnamed pr	gi 109083408 (+7)	<0.67	0	1.09
lysyl-tRNA synthetase [Homo sapiens]	gi 11095909 (+7)	<0.67	0	1.15
Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 [Homo sapiens]	gi 112292468 (+7)	<0.67	0	1.88
spectrin beta chain, brain 1 isoform 1 [Homo sapiens], gi 114577393 ref XP_515478.2 PREDICTED: similar to beta-spectrin isoform 5 [Pan troglodytes], gi 114577395 ref XP_001154084.1 PREDICTED: similar to beta-spectrin isoform 3 [Pan troglodytes], gi 1145	gi 112382250 (+4)	<0.67	0	1.19
PREDICTED: alpha isoform of regulatory subunit A, protein phosphatase 2 isoform 1 [Pan troglodytes], gi 114678865 ref XP_001174510.1 PREDICTED: alpha isoform of regulatory subunit A, protein phosphatase 2 isoform 4 [Pan troglodytes], gi 114678867 ref XP_	gi 114678863 (+12)	<0.67	0	1.56
Nucleoporin 160kDa [Homo sapiens], gi 115528953 gb AAI25228.1 Nucleoporin 160kDa [Homo sapiens]	gi 115528762 (+7)	<0.67	0	1.22
PA2G4 protein [Homo sapiens]	gi 116283988 (+6)	<0.67	0	1.56
thymopoietin zeta isoform [Homo sapiens]	gi 119214988 (+10)	<0.67	0	1.56
multifunctional protein ADE2 isoform 1 [Homo sapiens]	gi 119220559 (+5)	<0.67	0	2.03
phosphoglycerate mutase 1 (brain), isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119570325 (+16)	<0.67	0	4.12
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119580600 gb EAW60196.1 eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 168985244 emb	gi 119580599 (+9)	<0.67	0	1.16
ribosomal protein L19, isoform CRA_d [Homo sapiens]	gi 119580972 (+5)	<0.67	0	3.59
arginyl-tRNA synthetase [Homo sapiens]	gi 119581911 (+4)	<0.67	0	1.16
Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119582065 (+6)	<0.67	0	1.16
protease, serine, 15, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119589558 (+11)	<0.67	0	1.2
TAR DNA binding protein, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119592075 (+6)	<0.67	0	2.03
cofilin 1 (non-muscle), isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119594857 (+3)	<0.67	0	8.01
cathepsin Z, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119595855 (+8)	<0.67	0	2.3
hCG2022288 [Homo sapiens]	gi 119599350 (+10)	<0.67	0	4.83
glutamate dehydrogenase 1, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119600708 gb EAW80302.1 glutamate dehydrogenase 1, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 193784123 dbj BAG53667.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 119600706 (+10)	<0.67	0	1.23
hCG18050 [Homo sapiens]	gi 119616598 (+7)	<0.67	0	1.23
actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119618319 (+4)	<0.67	0	8.01
threonyl-tRNA synthetase, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119631208 (+7)	<0.67	0	1.09
signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119631258 (+7)	<0.67	0	1.09

prefoldin subunit 2 [Homo sapiens], gi 55588600 ref XP_513934.1 PREDICTED: hypothetical protein [Pan troglodytes], gi 109017735 ref XP_001117749.1 PREDICTED: prefoldin subunit 2-like [Macaca mulatta], gi 297662945 ref XP_002809945.1 PREDICTED: prefoldi	gi 12408675	<0.67	0	5.39
basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1 [Mus musculus], gi 38454312 ref NP_942084.1 basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1 [Rattus norvegicus], gi 57110923 ref XP_536025.1 PREDICTED: similar to basic leucine zipper and W	gi 13385296 (+7)	<0.67	0	2.03
proteasome subunit p42 [Homo sapiens]	gi 1526426 (+2)	<0.67	0	2.64
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C [Homo sapiens]	gi 153791492 (+8)	<0.67	0	1.2
ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast) [Homo sapiens], gi 190689917 gb ACE86733.1 ARP2 actin- related protein 2 homolog (yeast) protein [synthetic construct], gi 190691289 gb ACE87419.1 ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast) protein [syntheti	gi 15778930 (+2)	<0.67	0	2.64
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 158254936 (+3)	<0.67	0	1.56
Chain A, Nuclear Cap Binding Complex, gi 15988383 pdb 1H6K B Chain B, Nuclear Cap Binding Complex, gi 15988385 pdb 1H6K C Chain C, Nuclear Cap Binding Complex	gi 15988381 (+6)	<0.67	0	1.09
Procollagen-lysine 1, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 [Homo sapiens]	gi 16741721 (+5)	<0.67	0	1.09
Chain A, Crystal Structure Of Human Eukaryotic Translation Initiation Factor Eif5a, gi 183448389 pdb 3CPF B Chain B, Crystal Structure Of Human Eukaryotic Translation Initiation Factor Eif5a	gi 183448388 (+2)	<0.67	0	5.39
Chain A, Crystal Structure Of The Protein-Disulfide Isomerase Related Chaperone Erp29, gi 192987145 pdb 2QC7 B Chain B, Crystal Structure Of The Protein-Disulfide Isomerase Related Chaperone Erp29	gi 192987144 (+1)	<0.67	0	4.12
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 194384606 (+3)	<0.67	0	1.16
B-cell receptor-associated protein 31 isoform a [Homo sapiens], gi 119593226 gb EAW72820.1 B- cell receptor-associated protein 31, isoform CRA_b [Homo sapiens], gi 119593227 gb EAW72821.1 B- cell receptor-associated protein 31, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 213511508 (+3)	<0.67	0	4.12
THO complex subunit 4 [Homo sapiens]	gi 238776833 (+1)	<0.67	0	2.92
26S protease regulatory subunit 6B isoform 2 [Homo sapiens], gi 73947622 ref XP_867021.1 PREDICTED: similar to proteasome 26S ATPase subunit 4 isoform 2 isoform 2 [Canis familiaris], gi 114677263 ref XP_001140980.1 PREDICTED: proteasome 26S ATPase subun	gi 24430155 (+3)	<0.67	0	1.56
beta-cop homolog [Homo sapiens]	gi 5257007 (+1)	<0.67	0	1.12
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5- monooxygenase activation protein, theta polypeptide [Homo sapiens], gi 61358848 gb AA41629.1 tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5- monooxygenase activation protein theta polypeptide [synthetic construct]	gi 54696890 (+2)	<0.67	0	12.36

Chain A, Human Nicotinamide N-Methyltransferase, gi 118138436 pdb 2IIP B Chain B, Human Nicotinamide N-Methyltransferase, gi 118138437 pdb 2IIP C Chain C, Human Nicotinamide N-Methyltransferase, gi 118138438 pdb 2IIP D Chain D, Human Nicotinamide N-Methyl	gi 118138435 (+1)	<0.67	0	2.06
SUB1 homolog (S. cerevisiae) [Homo sapiens]	gi 16307067 (+3)	<0.67	0	2.69
PREDICTED: ARP1 actin-related protein 1 homolog A, centractin alpha isoform 1 [Pan troglodytes], gi 114632563 ref XP_001171550.1 PREDICTED: ARP1 actin-related protein 1 homolog A, centractin alpha isoform 2 [Pan troglodytes], gi 194378592 dbj BAG63461.1	gi 114632561 (+6)	<0.67	0	1.02
mannosyl-oligosaccharide glucosidase isoform 1 [Homo sapiens], gi 116242490 sp Q13724.5 GCS1_HUMAN RecName: Full=Mannosyl-oligosaccharide glucosidase; AltName: Full=Processing A-glucosidase I, gi 19913138 emb CAD19636.1 glucosidase I [Homo sapiens], gi 1	gi 149999606 (+2)	<0.67	0	0.55
Niemann-Pick disease C1 protein [Homo sapiens], gi 2276463 gb AAB63982.1 Niemann-Pick C disease protein [Homo sapiens], gi 5714634 gb AAD48006.1 Niemann-Pick C1 protein [Homo sapiens], gi 119621563 gb EAX01158.1 Niemann-Pick disease, type C1 [Homo sapiens]	gi 13430254 (+4)	<0.67	0	0.94
gamma-interferon-inducible protein 16 [Homo sapiens], gi 55959313 emb CAI15084.1 interferon, gamma-inducible protein 16 [Homo sapiens], gi 55959314 emb CAI15085.1 interferon, gamma-inducible protein 16 [Homo sapiens]	gi 112789562 (+10)	<0.67	0	0.56
family with sequence similarity 49, member B, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119612532 (+3)	<0.67	0	1.21
lysosome-associated membrane glycoprotein 1 precursor [Homo sapiens], gi 206729915 sp P11279.3 LAMP1_HUMAN RecName: Full=Lysosome-associated membrane glycoprotein 1; Short=LAMP-1; Short=Lysosome-associated membrane protein 1; AltName: Full=CD107 antigen-l	gi 112380628 (+5)	<0.67	0	0.6
PSMA7 protein [Homo sapiens]	gi 116283481 (+9)	<0.67	0	2.06
chondroitin sulfate proteoglycan 6 (bamacan), isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119569943 (+3)	<0.67	0	0.61
regulator of chromosome condensation isoform a [Homo sapiens], gi 46623048 gb AAH69198.1 Regulator of chromosome condensation 1 [Homo sapiens]	gi 114796644 (+8)	<0.67	0	0.78
MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae), isoform CRA_b [Homo sapiens], gi 194377230 dbj BAG63176.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 119624772 (+5)	<0.67	0	0.6
60S ribosomal protein L15 [Mus musculus], gi 15431293 ref NP_002939.2 60S ribosomal protein L15 [Homo sapiens], gi 20806169 ref NP_620814.1 60S ribosomal protein L15 [Rattus norvegicus], gi 118150852 ref NP_001071334.1 60S ribosomal protein L15 [Bos ta]	gi 13385036 (+4)	<0.67	0	1.8
S-adenosylhomocysteine hydrolase, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119596687 (+4)	<0.67	0	1.02

heat shock 70kDa protein 4, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119582699 (+8)	<0.67	0	0.6
Keratin 14 [Homo sapiens], gi 17512236 gb AAH19097.1 Keratin 14 [Homo sapiens], gi 30583211 gb AAP35850.1 keratin 14 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara, Koebner) [Homo sapiens], gi 60655733 gb AAX32430.1 keratin 14 [synthetic construct], gi	gi 12803709 (+2)	65	378.58	5.87
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 21754583 (+1)	41	190.03	4.67
keratin, type II cytoskeletal 5 [Homo sapiens], gi 143811411 sp P13647.3 K2C5_HUMAN RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 5; AltName: Full=58 kDa cytokeratin; AltName: Full=Cytokeratin-5; Short=CK-5; AltName: Full=Keratin-5; Short=K5; AltName: Full=	gi 119395754 (+1)	16	489.21	30.88
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 194373749	16	40.28	2.57
PREDICTED: keratin 6A [Pan troglodytes], gi 15559584 gb AAH14152.1 Keratin 6A [Homo sapiens]	gi 114644568	11	421.28	38.44
ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119618308 (+3)	3.8	3.61	0.94
Similar to cytoskeleton-associated protein 4 [Homo sapiens]	gi 19263767 (+5)	3.6	20.84	5.79
40S ribosomal protein S13 [Homo sapiens], gi 13386034 ref NP_080809.1 40S ribosomal protein S13 [Mus musculus], gi 39930505 ref NP_569116.1 40S ribosomal protein S13 [Rattus norvegicus], gi 49169798 ref NP_001001783.1 40S ribosomal protein S13 [Gallus]	gi 4506685	3.5	9.34	2.69
Chain A, L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Complexed With Acetoacetyl-CoA And Nad+, gi 10120605 pdb 1FOY B Chain B, L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Complexed With Acetoacetyl-CoA And Nad+	gi 10120604 (+16)	3.2	3.86	1.21
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 189054414 (+4)	3	1.73	0.58
apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial isoform 2 precursor [Homo sapiens], gi 4678807 emb CAB41267.1 hypothetical protein [Homo sapiens], gi 57208844 emb CAI42780.1 apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1 [Homo sapiens], gi 83405866 g	gi 22202629 (+4)	2.8	1.59	0.58
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1 [Homo sapiens]	gi 16877071 (+4)	2.7	6.43	2.42
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119610652 (+9)	2.5	5.86	2.32
Annexin A2 [Homo sapiens]	gi 18645167 (+4)	2.4	131.52	55.7
lamin A/C, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119573383 (+2)	2.4	53.45	22.62
40S ribosomal protein S14 [Homo sapiens], gi 31981100 ref NP_065625.2 40S ribosomal protein S14 [Mus musculus], gi 62859657 ref NP_001016722.1 hypothetical protein LOC549476 [Xenopus (Silurana) tropicalis], gi 68160915 ref NP_001020241.1 40S ribosomal	gi 5032051	2.4	6.43	2.69
transmembrane protein [Homo sapiens]	gi 1160963 (+7)	2.2	8.24	3.82
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 193787579 (+5)	2.2	2.56	1.15
ERO1-like (S. cerevisiae), isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119586051 (+2)	2.1	6.17	2.89

electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial isoform b [Homo sapiens], gi 194390186 dbj BAG61855.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 189181759 (+2)	2.1	2.57	1.21
ribosomal protein S19 [Homo sapiens]	gi 16924231 (+1)	2	6.74	3.42
mitochondrial citrate transport protein [Homo sapiens]	gi 1785635 (+3)	2	2.94	1.46
keratin 8, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119617057 (+3)	1.9	12.3	6.55
lysosome membrane protein 2 [Homo sapiens], gi 2498525 sp Q14108.2 SCRB2_HUMAN RecName: Full=Lysosome membrane protein 2; AltName: Full=85 kDa lysosomal membrane sialoglycoprotein; Short=LGP85; AltName: Full=CD36 antigen-like 2; AltName: Full=Lysosome mem	gi 5031631	1.9	1.03	0.55
cytochrome b5 reductase 3, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119593678 gb EAW73272.1 cytochrome b5 reductase 3, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119593679 gb EAW73273.1 cytochrome b5 reductase 3, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119593674 (+6)	1.8	6.21	3.5
neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1 [Homo sapiens], gi 160332335 sp Q09666.2 AHNK_HUMAN RecName: Full=Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK; AltName: Full=Desmoyokin	gi 61743954 (+1)	1.7	12.69	7.35
plectin isoform 1e [Homo sapiens], gi 40849934 gb AAR95679.1 plectin 3 [Homo sapiens]	gi 41322908 (+7)	1.6	107.84	67.93
Heat shock 70kDa protein 9 (mortalin) [Homo sapiens], gi 18645123 gb AAH24034.1 Heat shock 70kDa protein 9 (mortalin) [Homo sapiens], gi 167774151 gb ABZ92510.1 heat shock 70kDa protein 9 (mortalin) [synthetic construct]	gi 12653415 (+5)	1.6	13.95	8.65
peroxiredoxin 3, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119569781 (+4)	1.6	5.92	3.59
ribosomal protein L12, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119608073 (+3)	1.6	12.74	8.01
hCG1994130, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119570641 (+5)	1.6	4.45	2.8
PNAS-140 [Homo sapiens]	gi 12751117 (+10)	1.6	3.79	2.42
Ribosomal protein S6 [Homo sapiens]	gi 15342049 (+4)	1.5	5.82	3.88
ATPase family, AAA domain containing 3A, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119576592 (+7)	1.5	2.56	1.74
myosin-Ib isoform 1 [Homo sapiens], gi 240120050 ref NP_001155291.1 myosin-Ib isoform 1 [Homo sapiens], gi 68583739 sp O43795.3 MYO1B_HUMAN RecName: Full=Myosin-Ib; AltName: Full=MYH-1c; AltName: Full=Myosin I alpha; Short=MMI-alpha; Short=MMIa, gi 31565	gi 194328685 (+1)	1.5	1.78	1.22
Similar to ribophorin I [Homo sapiens]	gi 14124942 (+2)	1.4	11.94	8.68
dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 isoform 2 precursor [Homo sapiens], gi 57208255 emb CAI42668.1 ribophorin II [Homo sapiens], gi 119596479 gb EAW76073.1 ribophorin II, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 193788343 db	gi 209413738 (+3)	1.4	9.67	7.15
lamin B2, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119589784 (+1)	1.4	7.16	5.21
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 194387478 (+3)	1.4	4.86	3.47
MYL6 protein [Homo sapiens]	gi 113812151 (+5)	1.4	9.43	6.83

40S ribosomal protein S23 [Homo sapiens], gi 13195604 ref NP_077137.1 40S ribosomal protein S23 [Mus musculus], gi 17530965 ref NP_511172.1 40S ribosomal protein S23 [Rattus norvegicus], gi 77736325 ref NP_001029862.1 40S ribosomal protein S23 [Bos tau]	gi 4506701	1.4	7.47	5.39
heat shock protein gp96 precursor [Homo sapiens]	gi 15010550 (+2)	1.3	22.75	17.65
Chain A, Cyclophilin B Complexed With [d-(Cholinylester)ser8]- Cyclosporin	gi 1310882 (+4)	1.3	37.29	28.85
heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1 [Homo sapiens], gi 126352504 ref NP_001075247.1 heat shock cognate 71 kDa protein [Equus caballus], gi 197097502 ref NP_001125783.1 heat shock cognate 71 kDa protein [Pongo abelii], gi 57085907 ref XP_536543.1	gi 5729877	1.2	22.36	18.45
ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor [Homo sapiens], gi 114549 sp P06576.3 ATPB_HUMAN RecName: Full=ATP synthase subunit beta, mitochondrial; Flags: Precursor, gi 179281 gb AAA51809.1 ATP synthase beta subunit precursor [Homo sapiens], gi 1	gi 32189394 (+1)	1.2	26.9	21.74
78 kDa glucose-regulated protein precursor [Homo sapiens], gi 109112231 ref XP_001099110.1 PREDICTED: 78 kDa glucose-regulated protein isoform 2 [Macaca mulatta], gi 114626688 ref XP_520257.2 PREDICTED: heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated prot	gi 16507237 (+3)	1.2	19.7	16.79
malate dehydrogenase, mitochondrial precursor [Homo sapiens], gi 215274114 sp P40926.3 MDHM_HUMAN RecName: Full=Malate dehydrogenase, mitochondrial; Flags: Precursor, gi 119592202 gb EAW71796.1 malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial), isoform CRA_a [	gi 21735621 (+5)	1.2	8.44	6.89
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L [Homo sapiens]	gi 11527777 (+6)	1.2	4.32	3.47
Chain A, X-Ray Structure Of Mutant Galectin-1LACTOSE COMPLEX, gi 208435582 pdb 2ZKN B Chain B, X-Ray Structure Of Mutant Galectin-1LACTOSE COMPLEX	gi 208435581 (+3)	1.2	6.74	5.6
60S ribosomal protein L11 [Mus musculus], gi 15431290 ref NP_000966.2 60S ribosomal protein L11 [Homo sapiens], gi 115497634 ref NP_001069049.1 60S ribosomal protein L11 [Bos taurus], gi 149695161 ref XP_001504267.1 PREDICTED: similar to 60S ribosomal	gi 13385408 (+4)	1.2	13.11	11.25
guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha-inhibitory subunit [Homo sapiens]	gi 183182 (+3)	1.15	1.15	0
histone H3 [Homo sapiens]	gi 1568559 (+5)	1.1	36.44	32.64
hCG33299, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119597983 (+4)	1.1	6.43	5.98
Chain A, Solution Structure Of Calcium-Calmodulin N-Terminal Domain	gi 16974825	1.1	9.53	8.81
HuR RNA binding protein [Homo sapiens]	gi 1022961 (+3)	1.1	3.86	3.5

RecName: Full=Annexin A4; AltName: Full=35-beta calcimedin; AltName: Full=Annexin IV; AltName: Full=Annexin-4; AltName: Full=Carbohydrate-binding protein p33/p41; AltName: Full=Chromobindin-4; AltName: Full=Endonexin I; AltName: Full=Lipocortin IV; AltNam	gi 1703319 (+4)	1.1	3.86	3.62
histone H2B type 1-B [Homo sapiens], gi 74004182 ref XP_853817.1 PREDICTED: similar to H2B histone family, member F [Canis familiaris], gi 109069860 ref XP_001084180.1 PREDICTED: histone H2B type 1-B-like [Macaca mulatta], gi 114605771 ref XP_001172713.	gi 10800140 (+7)	1.1	22.9	20.5
cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial [Homo sapiens], gi 143811471 sp P47985.2 UCRI_HUMAN RecName: Full=Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial; AltName: Full=Complex III subunit 5; AltName: Full=Cytochrome b-c1 complex subun	gi 163644321 (+2)	1.1	1.97	1.8
hCG1640785, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119569329 (+1)	1.04	11.21	10.78
hCG21078 [Homo sapiens]	gi 119568094 (+4)	1.04	5.6	5.39
reticulon-4 isoform B [Homo sapiens], gi 4838517 gb AAD31021.1 AF132047_1 foocen-m [Homo sapiens], gi 10039553 gb AAG12177.1 AF148538_1 reticulon 4b [Homo sapiens], gi 9408098 emb CAB99249.1 Nogo-B protein [Homo sapiens], gi 11610577 dbj BAB18928.1 RTN-	gi 24431933 (+2)	1	1.58	1.56
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 158255378 (+2)	1	1.73	1.73
Ribosomal protein, large, P0 [Homo sapiens]	gi 12654583 (+5)	0.99	10.78	10.92
Chain A, Solution Structure Of Human Vdac-1 In Ldao Micelles	gi 198443050 (+4)	0.9	8.58	9.74
voltage-dependent anion channel 2, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119574955 gb EAW54570.1 voltage-dependent anion channel 2, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119574956 gb EAW54571.1 voltage-dependent anion channel 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119574954 (+8)	0.9	7.5	8.22
solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2, isoform CRA_e [Homo sapiens], gi 119594529 gb EAW74123.1 solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2, isoform CRA_e	gi 119594528 (+7)	0.9	3.96	4.5
leucine-rich repeat-containing protein 59 [Homo sapiens], gi 114669295 ref XP_511877.2 PREDICTED: leucine rich repeat containing 59 [Pan troglodytes], gi 74760704 sp Q96AG4.1 LRC59_HUMAN RecName: Full=Leucine-rich repeat-containing protein 59, gi 1687787	gi 40254924	0.9	6.2	6.89
60S ribosomal protein L36 [Homo sapiens], gi 16117796 ref NP_378669.1 60S ribosomal protein L36 [Homo sapiens], gi 160333837 ref NP_061200.2 60S ribosomal protein L36 [Mus musculus], gi 197101521 ref NP_001125613.1 60S ribosomal protein L36 [Pongo abel	gi 16117794 (+1)	0.9	4.85	5.6
voltage-dependent anion-selective channel protein 3 isoform a [Homo sapiens]	gi 208879465 (+1)	0.9	3.92	4.38
TNF receptor-associated protein 1, isoform CRA_d [Homo sapiens]	gi 119605748 (+5)	0.9	1.59	1.73

transmembrane protein 43, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119584590 (+7)	0.8	1.05	1.32
histone H2B type 1-D [Homo sapiens], gi 20336752 ref NP_619790.1 histone H2B type 1-D [Homo sapiens], gi 30061385 ref NP_835507.1 histone H2B type 1-M [Mus musculus], gi 114053057 ref NP_001039711.1 histone 1, H2bi [Bos taurus], gi 149731870 ref XP_001	gi 10800138 (+14)	0.8	43.48	52.27
HNRPU protein [Homo sapiens], gi 190689399 gb ACE86474.1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A) protein [synthetic construct], gi 190690761 gb ACE87155.1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment fa	gi 16041796 (+3)	0.8	10.84	14.25
Chain A, Crystal Structure Of Human Dead-Box Rna Helicase Ddx3x	gi 114794734 (+6)	0.8	4.26	5.67
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 158256826 (+2)	0.8	4.03	4.87
Keratin 18 [Homo sapiens]	gi 12653819 (+4)	0.8	5.31	6.4
hypothetical protein DKFZp762H157.1 - human (fragment), gi 7328175 emb CAB82418.1 hypothetical protein [Homo sapiens]	gi 11276938 (+2)	0.8	4.32	5.45
leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119602967 gb EAW82561.1 leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119602966 (+1)	0.8	2.59	3.27
lysosome-associated membrane glycoprotein 2 isoform C precursor [Homo sapiens], gi 45550060 gb AAS67876.1 lysosomal-associated membrane protein 2C [Homo sapiens], gi 119632287 gb EAX11882.1 lysosomal-associated membrane protein 2, isoform CRA_b [Homo sa	gi 169790833 (+6)	0.8	1.93	2.42
60S ribosomal protein L30 [Homo sapiens], gi 6677783 ref NP_033109.1 60S ribosomal protein L30 [Mus musculus], gi 12083659 ref NP_073190.1 60S ribosomal protein L30 [Rattus norvegicus], gi 77735815 ref NP_001029606.1 60S ribosomal protein L30 [Bos taur	gi 4506631	0.8	6.74	8.41
Chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma) [Homo sapiens], gi 123991503 gb ABM83940.1 chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma) [synthetic construct], gi 123999394 gb ABM87258.1 chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma) [synthetic construct]	gi 14124984 (+9)	0.8	0.88	1.16
PREDICTED: similar to protein phosphatase 1 isoform 3 [Pan troglodytes], gi 149050706 gb EDM02879.1 rCG61710, isoform CRA_a [Rattus norvegicus], gi 194381566 dbj BAG58737.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 114576744 (+138)	0.8	1.37	1.63
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 194381308 (+7)	0.8	0.86	1.09
nucleophosmin isoform 1 [Homo sapiens], gi 114662863 ref XP_001151979.1 PREDICTED: similar to nucleophosmin - human isoform 3 [Pan troglodytes], gi 114662865 ref XP_001152043.1 PREDICTED: similar to nucleophosmin - human isoform 4 [Pan troglodytes], gi	gi 10835063 (+12)	0.7	7.77	11.4

60S acidic ribosomal protein P2 [Homo sapiens], gi 302191627 ref NP_001180505.1 60S acidic ribosomal protein P2 [Macaca mulatta], gi 55635097 ref XP_508207.1 PREDICTED: hypothetical protein isoform 5 [Pan troglodytes], gi 114635452 ref XP_001149488.1 P	gi 4506671	0.7	8.89	13.05
PREDICTED: similar to ribosomal protein isoform 2 [Pan troglodytes], gi 119624101 gb EAX03696.1 ribosomal protein S18, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 114606879 (+1)	0.7	9.34	13.47
Unknown (protein for IMAGE:3906970) [Homo sapiens]	gi 15928913 (+1)	0.7	8.98	12.84
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 10435335 (+7)	0.7	2.72	3.97
ribosomal protein L24, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119600188 (+3)	0.7	7.57	11.25
ribosomal protein L27, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119581314 (+3)	0.7	1.87	2.69
unnamed protein product [Homo sapiens], gi 221045490 dbj BAH14422.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 221045314	0.7	1.15	1.63
hCG2032701, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119588050 gb EAW67646.1 hCG2032701, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119588047 (+4)	0.7	1.36	1.88
histone 1, H4c [Homo sapiens]	gi 119575932 (+3)	0.6	52.77	87.8
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 158261055 (+2)	0.6	7.14	12.22
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle [Homo sapiens]	gi 127798841 (+1)	0.6	4.71	8.03
hCG2028724 [Homo sapiens]	gi 119601423 (+6)	0.6	6.86	11.42
matrin-3 isoform a [Homo sapiens], gi 62750354 ref NP_954659.1 matrin-3 isoform a [Homo sapiens], gi 303227924 ref NP_001181883.1 matrin-3 isoform a [Homo sapiens], gi 303227926 ref NP_001181884.1 matrin-3 isoform a [Homo sapiens], gi 12643409 sp P4324	gi 21626466 (+3)	0.6	3.54	5.95
40S ribosomal protein S16 [Homo sapiens], gi 75812950 ref NP_001028796.1 40S ribosomal protein S16 [Bos taurus], gi 158966704 ref NP_038675.2 40S ribosomal protein S16 [Mus musculus], gi 212549659 ref NP_001131092.1 40S ribosomal protein S16 [Sus scrofa]	gi 4506691 (+1)	0.6	7.66	13.05
calnexin precursor [Homo sapiens], gi 66933005 ref NP_001019820.1 calnexin precursor [Homo sapiens], gi 543920 sp P27824.2 CALX_HUMAN RecName: Full=Calnexin; AltName: Full=IP90; AltName: Full=Major histocompatibility complex class I antigen- binding prote	gi 10716563 (+1)	0.6	2.64	4.64
RSL1D1 protein [Homo sapiens]	gi 118142826 (+8)	0.6	2.39	4.04
alpha-actinin-4 [Homo sapiens], gi 109124593 ref XP_001083825.1 PREDICTED: alpha-actinin-4-like isoform 5 [Macaca mulatta], gi 13123943 sp O43707.2 ACTN4_HUMAN RecName: Full=Alpha-actinin-4; AltName: Full=F- actin cross-linking protein; AltName: Full=Non-	gi 12025678 (+1)	0.6	7.75	12.89
RNA helicase II/Gu protein [Homo sapiens]	gi 11890755 (+3)	0.6	1.03	1.68
adaptor-related protein complex 1, beta 1 subunit, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119580203 (+5)	0.6	1.12	1.76
hCG19195 [Homo sapiens]	gi 119597218 (+6)	0.6	2.98	4.67
ribosomal protein [Homo sapiens]	gi 337518 (+1)	0.5	3.79	7.25

nucleolin, isoform CRA_c [Homo sapiens], gi 193785526 dbj BAG50892.1 unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 119591368 (+5)	0.5	7.27	15.97
annexin A1, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119582952	0.5	12.19	22.19
moesin, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119625804 (+1)	0.5	4.32	8.52
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform b [Homo sapiens], gi 288558857 sp P09651.5 ROA1_HUMAN RecName: Full=Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1; Short=hnRNP A1; AltName: Full=Helix-destabilizing protein; AltName: Full=Single-strand RNA-b	gi 14043070 (+2)	0.5	7.44	15.77
histone H1.5 [Homo sapiens], gi 19856407 sp P16401.3 H15_HUMAN RecName: Full=Histone H1.5; AltName: Full=Histone H1a, gi 603551 emb CAA58498.1 Histone H1.5 [Homo sapiens], gi 3080461 emb CAB11421.1 histone cluster 1, H1b [Homo sapiens], gi 22770677 gb A	gi 4885381	0.5	6.12	12.83
lamin-B1 isoform 1 [Homo sapiens], gi 125953 sp P20700.2 LMNB1_HUMAN RecName: Full=Lamin-B1, gi 307106 gb AAA36162.1 lamin B [Homo sapiens], gi 576840 gb AAC37575.1 lamin B1 [Homo sapiens], gi 74354337 gb AAI03724.1 Lamin B1 [Homo sapiens], gi 11956923	gi 5031877	0.5	3.98	8.08
protein disulfide isomerase-related protein 5 [Homo sapiens]	gi 1710248	0.5	4.58	10.08
60S ribosomal protein L6 [Homo sapiens], gi 67189747 ref NP_001019833.1 60S ribosomal protein L6 [Homo sapiens], gi 55638981 ref XP_509392.1 PREDICTED: similar to DNA-binding protein TAXREB107 isoform 12 [Pan troglodytes], gi 114647051 ref XP_001150295.	gi 16753227 (+6)	0.5	6.07	13.03
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119589327 (+4)	0.5	3.25	6.35
splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated), isoform CRA_e [Homo sapiens]	gi 119627830 (+2)	0.5	3.36	6.43
hCG1783090 [Homo sapiens]	gi 119582155 (+6)	0.5	5.88	11.42
oligosaccharyltransferase	gi 1581615 (+5)	0.5	1.42	3.11
ribosomal protein L23a [Homo sapiens]	gi 1574942 (+2)	0.5	8.49	18.43
ribosomal protein S8, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119627428 (+2)	0.5	5.39	10.3
Solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5 [Homo sapiens], gi 123982666 gb ABM83074.1 solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5 [synthetic construct], gi 123997339 gb ABM86271.1 solute carrier family 1 (n	gi 12652633 (+5)	0.5	1.36	2.61
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 189053888 (+4)	0.5	1.03	2.18
mutant beta-actin (beta'-actin) [Homo sapiens]	gi 28336	0.5	9.63	21.32
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 194382418 (+2)	0.5	1.49	3.05
ribosomal protein L9, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119613332 (+2)	0.5	1.97	3.59
Chain C, Crystal Structure Of The Human Sec23a24A HETERODIMER, Complexed With The Snare Protein Sec22b, gi 149242500 pdb 2NUT C Chain C, Crystal Structure Of The Human Sec23a24A HETERODIMER, Complexed With The Snare Protein Sec22b	gi 149242497 (+2)	0.5	1.97	3.59
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 194386896 (+3)	0.4	15.54	35.13

histone H2A type 1-C [Homo sapiens], gi 302563585 ref NP_001180707.1 histone H2A type 1-C [Macaca mulatta], gi 55625972 ref XP_518286.1 PREDICTED: similar to histone H2A [Pan troglodytes], gi 57110421 ref XP_545390.1 PREDICTED: similar to Histone H2A.I	gi 4504245	0.4	40.45	102.35
ATP-dependent RNA helicase A [Homo sapiens], gi 116241330 sp Q08211.4 DHX9_HUMAN RecName: Full=ATP-dependent RNA helicase A; AltName: Full=DEAH box protein 9; AltName: Full=Nuclear DNA helicase II; Short=NDH II, gi 55662450 emb CAH71701.1 DEAH (Asp-Glu-A	gi 100913206	0.4	6.88	17.54
polyubiquitin [Homo sapiens]	gi 2627129 (+26)	0.4	11.11	28.91
14-3-3 protein epsilon [Homo sapiens], gi 27806197 ref NP_776916.1 14-3-3 protein epsilon [Bos taurus], gi 55741616 ref NP_001006219.1 14-3-3 protein epsilon [Gallus gallus], gi 226874906 ref NP_033562.3 14-3-3 protein epsilon [Mus musculus], gi 556447	gi 5803225 (+1)	0.4	8.49	20.18
heat shock protein HSP 90-alpha isoform 1 [Homo sapiens]	gi 153792590 (+3)	0.4	8.24	20.43
liver histone H1e [Homo sapiens]	gi 126035028 (+6)	0.4	5.51	15.22
trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial precursor [Homo sapiens], gi 20141376 sp P40939.2 ECHA_HUMAN RecName: Full=Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial; AltName: Full=78 kDa gastrin-binding protein; AltName: Full=TP-alpha; Includes:	gi 20127408 (+1)	0.4	2.59	5.77
heat shock 70 kDa protein 1A/1B [Homo sapiens], gi 194248072 ref NP_005336.3 heat shock 70 kDa protein 1A/1B [Homo sapiens], gi 75061728 sp Q5R7D3.1 HSP71_PONAB RecName: Full=Heat shock 70 kDa protein 1, gi 147744565 sp P08107.5 HSP71_HUMAN RecName: Full	gi 167466173 (+3)	0.4	3.18	7.53
polyadenylate-binding protein 1 [Bos taurus], gi 46367787 ref NP_002559.2 polyadenylate-binding protein 1 [Homo sapiens], gi 73974128 ref XP_856675.1 PREDICTED: similar to Polyadenylate-binding protein 1 (Poly(A)-binding protein 1) (PABP 1) isoform 5 [C	gi 41386798 (+1)	0.4	1.73	4.61
SYNCRIP protein [Homo sapiens]	gi 116283697 (+13)	0.4	2.08	4.64
guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119574079 (+5)	0.4	2.57	7.25
Chain A, Phosphorylation Independent Interactions Between 14-3-3 And Exoenzyme S: From Structure To Pathogenesis, gi 161172139 pdb 2O02 B Chain B, Phosphorylation Independent Interactions Between 14-3-3 And Exoenzyme S: From Structure To Pathogenesis	gi 161172138 (+5)	0.4	7.19	18.54
60S ribosomal protein L13 [Homo sapiens], gi 15431297 ref NP_000968.2 60S ribosomal protein L13 [Homo sapiens], gi 21903462 sp P26373.4 RL13_HUMAN RecName: Full=60S ribosomal protein L13; AltName: Full=Breast basic conserved protein 1, gi 13436332 gb AAH	gi 15431295 (+1)	0.4	3.59	8.24
leucine-zipper protein FKSG13 [Homo sapiens]	gi 11034809 (+3)	0.4	1.05	2.78

splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor), isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119614893 (+2)	0.4	2.35	5.74
procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119599346 (+4)	0.4	1.03	2.8
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 10435664 (+5)	0.4	0.89	2.49
histone H2A.Z [Homo sapiens], gi 7949045 ref NP_058030.1 histone H2A.Z [Mus musculus], gi 12083611 ref NP_073165.1 histone H2A.Z [Rattus norvegicus], gi 27807373 ref NP_777234.1 histone H2A.Z [Bos taurus], gi 57164301 ref NP_001009270.1 histone H2A.Z	gi 4504255 (+2)	0.4	8.76	19.62
A0=heterogeneous nuclear ribonucleoprotein [human, placenta, Peptide, 305 aa]	gi 1911429 (+1)	0.4	1.18	2.78
ribosomal protein L22, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119591926 (+4)	0.4	2.69	6.83
ribosomal protein L35, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119608007 gb EAW87601.1 ribosomal protein L35, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119608006 (+4)	0.3	1.87	5.39
vimentin [Homo sapiens], gi 55977767 sp P08670.4 VIME_HUMAN RecName: Full=Vimentin, gi 37850 emb CAA39600.1 unnamed protein product [Homo sapiens], gi 7576229 emb CAB87963.1 vimentin [Homo sapiens], gi 13111801 gb AAH00163.2 Vimentin [Homo sapiens], gi	gi 62414289	0.3	20.51	74.8
actin, beta [Homo sapiens]	gi 14250401 (+8)	0.3	26.08	93.71
alpha-actinin-1 isoform a [Homo sapiens], gi 94982457 gb ABF50047.1 actinin alpha 1 isoform b [Homo sapiens]	gi 194097350 (+4)	0.3	12.14	40.21
mitochondrial heat shock 60kD protein 1 variant 1 [Homo sapiens]	gi 189502784 (+2)	0.3	11.06	33.17
PREDICTED: clathrin heavy chain 1 isoform 6 [Pan troglodytes], gi 119614801 gb EAW94395.1 clathrin, heavy polypeptide (Hc), isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 114669629 (+5)	0.3	9.1	26.38
heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 isoform B1 [Homo sapiens], gi 73976084 ref XP_532495.2 PREDICTED: similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1) isoform 1 [Canis familiaris], gi 109067105 ref XP_001094282.1	gi 14043072 (+2)	0.3	8.03	30.99
heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 isoform a [Homo sapiens], gi 117190192 ref NP_001070910.1 heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 isoform a [Homo sapiens], gi 197097844 ref NP_001125784.1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C [	gi 117189975 (+10)	0.3	8.72	25.5
Chain A, Human Muscle L-Lactate Dehydrogenase M Chain, Ternary Complex With Nadh And Oxamate, gi 13786850 pdb 1110 B Chain B, Human Muscle L-Lactate Dehydrogenase M Chain, Ternary Complex With Nadh And Oxamate, gi 13786851 pdb 1110 C Chain C, Human Muscle	gi 13786849 (+2)	0.3	5.89	18.49
serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1), isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119595384 (+2)	0.3	2.84	10.36
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 221040426 (+1)	0.3	2.08	6.25

heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119631470 gb EAX11065.1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 194375464 dbj BAG56677.1 unnamed protein product [Homo sapiens], gi 2210462	gi 119631468 (+2)	0.3	2.38	7.22
ribosomal protein L18, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119572744 (+4)	0.3	3.95	12.64
protein kinase C substrate 80K-H, isoform CRA_b [Homo sapiens], gi 168279101 dbj BAG11430.1 glucosidase 2 subunit beta precursor [synthetic construct]	gi 119604622 (+5)	0.3	1.03	3.88
exportin-2 [Homo sapiens], gi 109091663 ref XP_001100735.1 PREDICTED: exportin-2 isoform 4 [Macaca mulatta], gi 114682541 ref XP_001166085.1 PREDICTED: CSE1 chromosome segregation 1-like protein isoform 6 [Pan troglodytes], gi 297259618 ref XP_002798148	gi 29029559 (+2)	0.3	1.12	3.92
spliceosomal protein SAP 155 [Homo sapiens]	gi 4033735 (+1)	0.3	0.89	3.13
PREDICTED: aspartate aminotransferase 2 isoform 2 [Pan troglodytes], gi 179104 gb AAA35568.1 aspartate aminotransferase precursor (2.6.1.1) [Homo sapiens], gi 119603394 gb EAW82988.1 glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotra	gi 114662906 (+5)	0.3	1.68	5.06
40S ribosomal protein S11 [Homo sapiens], gi 13592071 ref NP_112372.1 40S ribosomal protein S11 [Rattus norvegicus], gi 21426889 ref NP_038753.1 40S ribosomal protein S11 [Mus musculus], gi 307691227 ref NP_001182683.1 ribosomal protein S11 [Macaca mul	gi 4506681	0.3	4.25	16.01
SERPINE1 mRNA binding protein 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119626894 (+12)	0.3	0.5	2.01
myosin-9 [Homo sapiens], gi 6166599 sp P35579.4 MYH9_HUMAN RecName: Full=Myosin-9; AltName: Full=Cellular myosin heavy chain, type A; AltName: Full=Myosin heavy chain 9; AltName: Full=Myosin heavy chain, non-muscle IIa; AltName: Full=Non-muscle myosin hea	gi 12667788	0.2	16.97	68.91
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 193786502 (+1)	0.2	11.24	60.78
elongation factor 1-alpha 1 [Homo sapiens], gi 57114194 ref NP_001009165.1 elongation factor 1-alpha 1 [Pan troglodytes], gi 57163863 ref NP_001009326.1 elongation factor 1-alpha 1 [Felis catus], gi 68299807 ref NP_776960.1 elongation factor 1-alpha 1	gi 4503471 (+5)	0.2	10.37	42.53
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]	gi 31645	0.2	13.52	57.61
keratin 1 [Homo sapiens], gi 39794653 gb AAH63697.1 Keratin 1 [Homo sapiens]	gi 11935049 (+1)	0.2	4.2	26.45
protein disulfide-isomerase precursor [Homo sapiens], gi 2507460 sp P07237.3 PDIA1_HUMAN RecName: Full=Protein disulfide-isomerase; Short=PDI; AltName: Full=Cellular thyroid hormone-binding protein; AltName: Full=Prolyl 4-hydroxylase subunit beta; AltName	gi 20070125 (+1)	0.2	3.45	18.93

40S ribosomal protein S9 [Homo sapiens], gi 33504483 ref NP_084043.1 40S ribosomal protein S9 [Mus musculus], gi 110347598 ref NP_112370.2 40S ribosomal protein S9 [Rattus norvegicus], gi 155372029 ref NP_001094622.1 40S ribosomal protein S9 [Bos taurus]	gi 14141193 (+1)	0.2	3.95	19.26
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A [Homo sapiens], gi 74136179 ref NP_001027981.1 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A [Macaca mulatta], gi 114613182 ref XP_001148333.1 PREDICTED: peptidylprolyl isomerase A isoform 6 [Pan troglodytes], gi 114613184	gi 10863927 (+8)	0.2	5.6	29.64
myosin-Ic isoform a [Homo sapiens]	gi 124494238 (+6)	0.2	0.89	3.61
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18 [Homo sapiens], gi 13097183 gb AAH03360.1 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18 [Homo sapiens], gi 19353239 gb AAH24739.1 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18 [Homo sapiens]	gi 12654791 (+5)	0.2	0.86	4.66
MYB binding protein (P160) 1a, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119610843 (+5)	0.2	0.89	5.24
tat-associated protein	gi 1096067 (+5)	0.2	1.96	8
ribosomal protein L26 [Homo sapiens]	gi 292435 (+2)	0.2	4.25	20.02
RNA binding protein, autoantigenic (hnRNP-associated with lethal yellow homolog (mouse)), isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119596694 (+8)	0.2	0.58	3.26
Chain A, Human Heart L-Lactate Dehydrogenase H Chain, Ternary Complex With Nadh And Oxamate, gi 13786848 pdb 110Z B Chain B, Human Heart L-Lactate Dehydrogenase H Chain, Ternary Complex With Nadh And Oxamate	gi 13786847 (+2)	0.2	1.18	5.74
ribosomal protein L35a, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119612656 (+2)	0.2	1.75	8.41
ribosomal protein L8, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119602455 (+5)	0.2	0.98	4.38
proactivator polypeptide isoform b preproprotein [Homo sapiens], gi 220064 dbj BAA00321.1 sphingolipid activator proteins [Homo sapiens], gi 261857894 dbj BAI45469.1 prosaposin [synthetic construct], gi 363557 prf 1504251A sphingolipid activator	gi 110224476 (+10)	0.2	1.49	9.92
protein S100-A6 [Homo sapiens], gi 109016378 ref XP_001110793.1 PREDICTED: protein S100-A6 isoform 1 [Macaca mulatta], gi 297663481 ref XP_002810202.1 PREDICTED: protein S100-A6-like isoform 1 [Pongo abelii], gi 297663483 ref XP_002810203.1 PREDICTED:	gi 7657532	0.2	1.49	9.34
PREDICTED: hypothetical protein isoform 19 [Pan troglodytes], gi 119583080 gb EAW62676.1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 114625192 (+8)	0.1	3.52	25.72
X-ray repair cross-complementing protein 6 [Homo sapiens], gi 125729 sp P12956.2 XRCC6_HUMAN RecName: Full=X-ray repair cross-complementing protein 6; AltName: Full=5'-deoxyribose-5-phosphate lyase Ku70; Short=5'-dRP lyase Ku70; AltName: Full=70 kDa subun	gi 4503841	0.1	2.39	17.91

X-ray repair cross-complementing protein 5 [Homo sapiens], gi 125731 sp P13010.3 XRCC5_HUMAN RecName: Full=X-ray repair cross-complementing protein 5; AltName: Full=86 kDa subunit of Ku antigen; AltName: Full=ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2; AltName	gi 10863945 (+1)	0.1	1.9	14.5
Chain A, Structural And Electrophysiological Analysis Of Annexin V Mutants. Mutagenesis Of Human Annexin V, An In Vitro Voltage-Gated Calcium Channel, Provides Information About The Structural Features Of The Ion Pathway, The Voltage Sensor And The Ion Se	gi 157831404 (+3)	0.1	2.57	18.12
fatty acid synthase [Homo sapiens]	gi 119610151 (+4)	0.1	1.12	10.23
peroxiredoxin 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119627382 (+3)	0.1	3.79	27.59
Chain B, Crystal Structures Of Native And Inhibited Forms Of Human Cathepsin D: Implications For Lysosomal Targeting And Drug Design, gi 157879204 pdb 1LYA D Chain D, Crystal Structures Of Native And Inhibited Forms Of Human Cathepsin D: Implications For	gi 157879202 (+1)	0.1	1.8	17.62
ribosomal protein SA, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119584991 (+8)	0.1	1.05	7.08
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 10436857 (+5)	0.1	1.18	7.85
Human Diff6,H5,CDC10 homologue [Homo sapiens]	gi 1040689 (+9)	0.1	0.52	5.29
PREDICTED: protein disulfide isomerase-associated 3 isoform 1 [Pan troglodytes], gi 119597641 gb EAW77235.1 protein disulfide isomerase family A, member 3, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 114656687 (+7)	0.09	0.55	6.23
Valosin-containing protein [Homo sapiens]	gi 111305821 (+1)	0.07	3.96	58.89
Tubulin, beta [Homo sapiens]	gi 18088719 (+3)	0.06	2.52	38.81
156 kDa Protein [Homo sapiens]	gi 296164 (+1)	0.06	1.04	17.62
polypyrimidine tract binding protein 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119581557 (+5)	0.05	0.55	11.38
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 158257374 (+3)	0.05	0.71	15.6
RecName: Full=Elongation factor Tu, mitochondrial; Short=EF-Tu; AltName: Full=P43; Flags: Precursor, gi 899285 emb CAA59169.1 mitochondrial elongation factor Tu [Homo sapiens]	gi 1706611 (+3)	0.04	0.71	18.02
stomatin (EPB72)-like 2 variant [Homo sapiens]	gi 62897765 (+1)	0.04	0.52	13.22
Chain A, Crystal Structure Of Human Phosphoglycerate Kinase Bound To D-Adp, gi 193506672 pdb 3C39 A Chain A, Crystal Structure Of Human Phosphoglycerate Kinase Bound To 3-Phosphoglycerate, gi 193506673 pdb 3C39 B Chain B, Crystal Structure Of Human Phosph	gi 193506632 (+3)	0.01	0.52	34.98

Anexo 2. Proteínas identificadas e seus valores quantitativos em fibroblastos normais e em fibroblastos tumorais segundo análise pelo software Scaffold.

			Fibroblastos normais	Fibroblastos tumorais
Proteínas Identificadas (126)	Número de Acesso	Fold Change	Valor Quantitativo	Valor Quantitativo
aminopeptidase N precursor [Homo sapiens], gi 143811362 sp P15144.4 AMPN_HUMAN RecName: Full=Aminopectidase N; Short=AP-N; Short=hAPN; AltName: Full=Alanyl aminopectidase; AltName: Full=Aminopectidase M; Short=AP-M; AltName: Full=Microsomal aminopectidase	gi 157266300 (+2)	>1.5	20.7	0
tenascin C (hexabrachion), isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119607841 gb EAW87435.1 tenascin C (hexabrachion), isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119607840 (+5)	>1.5	19.52	0
keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris), isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119581085 (+4)	>1.5	23.22	0
epidermal cytokeratin 2 [Homo sapiens], gi 2565257 gb AAB81946.1 keratin 2e [Homo sapiens]	gi 181402 (+1)	>1.5	15.27	0
KIAA1398 protein [Homo sapiens]	gi 14133249	>1.5	12.2	0
nascent polypeptide-associated complex subunit alpha isoform b [Homo sapiens], gi 163965362 ref NP_001106672.1 nascent polypeptide-associated complex subunit alpha isoform b [Homo sapiens], gi 163965364 ref NP_001106673.1 nascent polypeptide-associated	gi 5031931 (+1)	>1.5	4.3	0
ribosomal protein S8, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119627428 (+1)	>1.5	7.95	0
ribosomal protein S24, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119575004 (+13)	>1.5	5.2	0
stathmin 1/oncoprotein 18 [Homo sapiens]	gi 122890670 (+5)	>1.5	4.16	0
Chain A, Crystal Structure Of Human Translationally Controlled Tumour Associated Protein, gi 109156945 pdb 1YZ1 B Chain B, Crystal Structure Of Human Translationally Controlled Tumour Associated Protein, gi 109156946 pdb 1YZ1 C Chain C, Crystal Structure	gi 109156944 (+11)	>1.5	7.59	0
RecName: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein; AltName: Full=Alpha-2-Z-globulin; AltName: Full=Ba-alpha-2-glycoprotein; AltName: Full=Fetuin-A; Contains: RecName: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein chain A; Contains: RecName: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein chain B; Flags	gi 112910 (+5)	>1.5	6.46	0
PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2-like isoform 2 [Macaca mulatta], gi 114651861 ref XP_001150159.1 PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1 isoform 2 [Pan troglodytes], gi 58476967 gb AAH89438.1 HNRPC protein [	gi 109082737 (+12)	>1.5	1.83	0
ribosomal protein L24, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119600188 (+3)	>1.5	2.96	0
transmembrane emp24 protein transport domain containing 9, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119605373 (+4)	>1.5	3.23	0

protein kinase C substrate 80K-H, isoform CRA_b [Homo sapiens], gi 168279101 dbj BAG11430.1 glucosidase 2 subunit beta precursor [synthetic construct]	gi 119604622 (+8)	>1.5	3.39	0
neprilysin [Homo sapiens], gi 116256329 ref NP_000893.2 neprilysin [Homo sapiens], gi 116256331 ref NP_009219.2 neprilysin [Homo sapiens], gi 116256333 ref NP_009220.2 neprilysin [Homo sapiens], gi 128062 sp P08473.2 NEP_HUMAN RecName: Full=Neprilysin;	gi 116256327 (+4)	>1.5	2.24	0
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B1 (Renal tubular acidosis with deafness), isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119620197 (+11)	>1.5	5.49	0
cold inducible RNA binding protein, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119589927 (+7)	>1.5	1.66	0
high mobility group AT-hook 1, isoform CRA_b [Homo sapiens], gi 119624173 gb EAX03768.1 high mobility group AT-hook 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119624168 (+5)	>1.5	1.66	0
TCOF1 protein [Homo sapiens]	gi 117938784 (+13)	>1.5	18.3	0
nucleosome assembly protein 1-like 1, isoform CRA_b [Homo sapiens], gi 119617723 gb EAW97317.1 nucleosome assembly protein 1-like 1, isoform CRA_b [Homo sapiens], gi 119617725 gb EAW97319.1 nucleosome assembly protein 1-like 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119617721 (+6)	>1.24	1.24	0
filamin-A isoform 1 [Homo sapiens], gi 57284167 emb CAI43199.1 filamin A, alpha (actin binding protein 280) [Homo sapiens], gi 57284203 emb CAI43227.1 filamin A, alpha (actin binding protein 280) [Homo sapiens], gi 119593152 gb EAW72746.1 filamin A, al	gi 116063573 (+7)	<0.67	0	31.05
histone H2B.1 [Homo sapiens]	gi 184086	<0.67	0	26.62
myosin-9 [Homo sapiens], gi 6166599 sp P35579.4 MYH9_HUMAN RecName: Full=Myosin-9; AltName: Full=Cellular myosin heavy chain, type A; AltName: Full=Myosin heavy chain 9; AltName: Full=Myosin heavy chain, non-muscle IIa; AltName: Full=Non-muscle myosin hea	gi 12667788	<0.67	0	15.31
Chain C, Structure Of The H3-H4 Chaperone Asf1 Bound To Histones H3 And H4, gi 304446003 pdb 3NQJ B Chain B, Crystal Structure Of (Cenp-AH4)2 HETEROTETRAMER	gi 119389962 (+7)	<0.67	0	18.49
carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119590899 (+8)	<0.67	0	13.03
pyruvate kinase, muscle, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119598292 (+11)	<0.67	0	10.66
neuroblast differentiation-associated protein AHNK isoform 1 [Homo sapiens], gi 160332335 sp Q09666.2 AHNK_HUMAN RecName: Full=Neuroblast differentiation-associated protein AHNK; AltName: Full=Desmoyokin	gi 61743954	<0.67	0	8.25
mitochondrial heat shock 60kD protein 1 variant 1 [Homo sapiens]	gi 189502784 (+4)	<0.67	0	7.95
collagen, type VI, alpha 3, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119591511 (+9)	<0.67	0	5.81

elongation factor 2 [Homo sapiens], gi 119172 sp P13639.4 EF2_HUMAN RecName: Full=Elongation factor 2; Short=EF-2, gi 88909610 sp Q5R8Z3.3 EF2_PONAB RecName: Full=Elongation factor 2; Short=EF-2, gi 31106 emb CAA35829.1 elongation factor 2 [Homo sapiens]	gi 4503483	<0.67	0	4.91
plectin [Homo sapiens], gi 1477651 gb AAB05428.1 plectin [Homo sapiens]	gi 1477646 (+8)	<0.67	0	3.81
transgelin 2, isoform CRA_e [Homo sapiens]	gi 119573148 (+5)	<0.67	0	4.14
MYL6 protein [Homo sapiens]	gi 113812151 (+9)	<0.67	0	4.3
hemoglobin alpha 1 globin chain [Homo sapiens]	gi 13195586 (+31)	<0.67	0	4.37
Chain A, Crystal Structure Of Pi Class Glutathione Transferase, gi 11514449 pdb 1EOG B Chain B, Crystal Structure Of Pi Class Glutathione Transferase	gi 11514448 (+21)	<0.67	0	3.73
60S acidic ribosomal protein P2 [Homo sapiens], gi 302191627 ref NP_001180505.1 60S acidic ribosomal protein P2 [Macaca mulatta], gi 114635454 ref XP_001149567.1 PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P2 isoform 3 [Pan troglodytes], gi 332264678 ref XP	gi 4506671	<0.67	0	3.54
clathrin, heavy polypeptide (Hc), isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119614803 (+5)	<0.67	0	2.12
ribosomal protein [Homo sapiens]	gi 337518 (+2)	<0.67	0	2.87
keratin 17, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119581154 (+5)	<0.67	0	1.77
Arginine-rich, mutated in early stage tumors [Homo sapiens], gi 109731750 gb AAI13589.1 Arginine-rich, mutated in early stage tumors [Homo sapiens], gi 158257918 dbj BAF84932.1 unnamed protein product [Homo sapiens], gi 313884014 gb ADR83493.1 mesenceph	gi 109730545 (+6)	<0.67	0	3.33
hCG2000485 [Homo sapiens]	gi 119614756 (+4)	<0.67	0	3.33
40S ribosomal protein S16 [Homo sapiens], gi 75812950 ref NP_001028796.1 40S ribosomal protein S16 [Bos taurus], gi 158966704 ref NP_038675.2 40S ribosomal protein S16 [Mus musculus], gi 212549659 ref NP_001131092.1 40S ribosomal protein S16 [Sus scrofa]	gi 4506691 (+3)	<0.67	0	2.7
RAB1A, member RAS oncogene family, isoform CRA_f [Homo sapiens]	gi 119620329 (+10)	<0.67	0	2.18
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 194390980 (+8)	<0.67	0	2.43
talin 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119578757 (+7)	<0.67	0	1.62
ribosomal protein S19, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119577478 (+2)	<0.67	0	2.29
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 193788318 (+5)	<0.67	0	8.13
tat-associated protein	gi 1096067 (+7)	<0.67	0	1.66
spectrin beta chain, brain 1 isoform 1 [Homo sapiens], gi 114577397 ref XP_001154155.1 PREDICTED: spectrin beta chain, brain 1 isoform 4 [Pan troglodytes], gi 116242799 sp Q01082.2 SPTB2_HUMAN RecName: Full=Spectrin beta chain, brain 1; AltName: Full=Bet	gi 112382250 (+7)	<0.67	0	1.11
ATP citrate lyase, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119581184 (+7)	<0.67	0	1.03
Thy-1 cell surface antigen, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119587893 (+3)	<0.67	0	1.49
hCG33299, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119597983 (+11)	<0.67	0	1.49
fatty acid synthase [Homo sapiens]	gi 119610151 (+4)	<0.67	0	1.03

ribosomal protein L30, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119612175 (+1)	<0.67	0	1.66
splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated), isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119627826 (+8)	<0.67	0	1.03
Ribosomal protein, large, P0 [Homo sapiens]	gi 12654583 (+5)	<0.67	0	1.22
SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial precursor [Homo sapiens], gi 74762723 sp Q9GZT3.1 SLIRP_HUMAN RecName: Full=SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial; Flags: Precursor, gi 12005807 gb AAG44629.1 AF253980_1 D	gi 13654278	<0.67	0	1.66
Chain A, Solution Structure Of Calcium-Calmodulin N-Terminal Domain	gi 16974825	<0.67	0	1.66
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 193783543 (+6)	<0.67	0	1.03
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 193785841 (+2)	<0.67	0	4.16
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 194389846 (+1)	<0.67	0	1.38
PREDICTED: alpha-actinin-4 isoform 2 [Nomascus leucogenys], gi 119577213 gb EAW56809.1 actinin, alpha 4, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 332207231 (+3)	<0.67	0	2.58
Chain A, Crystal Structure Of Calcium-Free (Or Apo) Human S100a6; Cys3met Mutant (Selenomethionine Derivative)	gi 20664042	<0.67	0	1.36
microtubule-associated protein 1B, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 122703744 tpe CAM12311.1 TPA: microtubule-associated protein 1B [Homo sapiens]	gi 119616102 (+2)	12	12.21	0.99
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 [Homo sapiens]	gi 111306451 (+17)	9.1	6.78	0.75
A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119568138 (+8)	8.3	8.23	0.99
hCG37214, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119622042 (+6)	6.5	8.21	1.26
nucleophosmin isoform 1 [Homo sapiens], gi 114662863 ref XP_001151979.1 PREDICTED: nucleophosmin isoform 3 [Pan troglodytes], gi 114762 sp P06748.2 NPM_HUMAN RecName: Full=Nucleophosmin; Short=NPM; AltName: Full=Nucleolar phosphoprotein B23; AltName: Ful	gi 10835063 (+8)	6.3	8.19	1.3
calreticulin, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119604736 (+2)	5.3	16.93	3.18
heat shock protein HSP 90-alpha isoform 1 [Homo sapiens]	gi 153792590 (+4)	5.3	19.11	3.61
moesin, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119625804 (+1)	5.3	10.84	2.03
40S ribosomal protein S9 [Homo sapiens], gi 33504483 ref NP_084043.1 40S ribosomal protein S9 [Mus musculus], gi 110347598 ref NP_112370.2 40S ribosomal protein S9 [Rattus norvegicus], gi 155372029 ref NP_001094622.1 40S ribosomal protein S9 [Bos taurus]	gi 14141193 (+2)	4.7	3.48	0.75
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 194388618 (+2)	4.4	10.53	2.39
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 158256826 (+2)	4.3	4.41	1.03
lysosome-associated membrane glycoprotein 2 isoform C precursor [Homo sapiens], gi 45550060 gb AAS67876.1 lysosomal-associated membrane protein 2C [Homo sapiens], gi 119632287 gb EAX11882.1 lysosomal-associated membrane protein 2, isoform CRA_b [Homo sa	gi 169790833 (+5)	4.2	2.17	0.52
lamin A/C, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119573383 (+5)	4.1	21.74	5.25

calnexin precursor [Homo sapiens], gi 66933005 ref NP_001019820.1 calnexin precursor [Homo sapiens], gi 543920 sp P27824.2 CALX_HUMAN RecName: Full=Calnexin; AltName: Full=IP90; AltName: Full=Major histocompatibility complex class I antigen- binding prote	gi 10716563 (+2)	3.9	2.03	0.52
Chain A, Cyclophilin B Complexed With [d- (Cholinylester)ser8]- Cyclosporin	gi 1310882 (+4)	3.6	6.06	1.66
keratin 1 [Homo sapiens], gi 39794653 gb AAH63697.1 Keratin 1 [Homo sapiens]	gi 11935049 (+2)	3.5	22.92	6.62
Chain A, Crystal Structure Of Human Eukaryotic Translation Initiation Factor Eif5a, gi 183448389 pdb 3CPF B Chain B, Crystal Structure Of Human Eukaryotic Translation Initiation Factor Eif5a	gi 183448388 (+2)	3.1	5.2	1.66
lysosome-associated membrane glycoprotein 1 precursor [Homo sapiens], gi 206729915 sp P11279.3 LAMP1_HUMAN RecName: Full=Lysosome-associated membrane glycoprotein 1; Short=LAMP-1; Short=Lysosome- associated membrane protein 1; AltName: Full=CD107 antigen-l	gi 112380628 (+7)	2.9	1.49	0.52
heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 isoform B1 [Homo sapiens], gi 73976084 ref XP_532495.2 PREDICTED: similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1) isoform 1 [Canis familiaris], gi 109067105 ref XP_001094282.1	gi 14043072 (+3)	2.6	7.27	2.8
leucine-rich repeat-containing protein 59 [Homo sapiens], gi 114669295 ref XP_511877.2 PREDICTED: leucine-rich repeat-containing protein 59 [Pan troglodytes], gi 74760704 sp Q96AG4.1 LRC59_HUMAN RecName: Full=Leucine-rich repeat-containing protein 59, gi	gi 40254924	2.5	1.86	0.75
MHC class I antigen [Homo sapiens]	gi 118721276 (+33)	2.4	3.05	1.26
ribosomal protein L18, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119572744 (+5)	2.3	6.52	2.87
unnamed protein product [Homo sapiens]	gi 194378142 (+3)	2.1	19.67	9.2
myosin regulatory light chain 12B [Homo sapiens], gi 21728376 ref NP_075891.1 myosin regulatory light chain 12B [Mus musculus], gi 203097095 ref NP_059039.2 myosin regulatory light chain 12B [Rattus norvegicus], gi 222144324 ref NP_001138416.1 myosin r	gi 15809016 (+3)	1.9	7.8	4.02
Chain A, High Resolution Solution Nmr Structure Of Mixed Disulfide Intermediate Between Mutant Human Thioredoxin And A 13 Residue Peptide Comprising Its Target Site In Human Nfkb, gi 1065113 pdb 1MDJ A Chain A, High Resolution Solution Nmr Structure Of Mi	gi 1065111 (+14)	1.8	8.43	4.68
elongation factor 1-alpha 1 [Homo sapiens], gi 57114194 ref NP_001009165.1 elongation factor 1-alpha 1 [Pan troglodytes], gi 57163863 ref NP_001009326.1 elongation factor 1-alpha 1 [Felis catus], gi 68299807 ref NP_776960.1 elongation factor 1- alpha 1	gi 4503471 (+8)	1.7	15.5	9.12

Chain A, Crystal Structure Of Human Galectin-1 In Complex With Lactobionic Acid, gi 310942926 pdb 3OY8 B Chain B, Crystal Structure Of Human Galectin-1 In Complex With Lactobionic Acid, gi 310942927 pdb 3OYW A Chain A, Crystal Structure Of Human Galectin-	gi 310942925 (+7)	1.7	23.73	13.97
78 kDa glucose-regulated protein precursor [Homo sapiens], gi 109112231 ref XP_001099110.1 PREDICTED: 78 kDa glucose-regulated protein isoform 2 [Macaca mulatta], gi 114626688 ref XP_520257.2 PREDICTED: 78 kDa glucose-regulated protein isoform 3 [Pan tr	gi 16507237 (+1)	1.7	16.98	10.16
heat shock protein gp96 precursor [Homo sapiens]	gi 15010550 (+2)	1.6	5.09	3.09
VIM [Homo sapiens]	gi 47115317 (+1)	1.4	170.28	117.63
transgelin, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119587704 (+3)	1.4	6.97	5.11
ATP synthase beta subunit [Homo sapiens]	gi 179279 (+3)	1.03	3.66	3.54
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U isoform b [Homo sapiens], gi 13097201 gb AAH03367.1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A) [Homo sapiens], gi 13177673 gb AAH03621.1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (s	gi 14141161 (+8)	0.96	1.49	1.55
polyubiquitin [Homo sapiens]	gi 2627129	0.9	8.94	9.44
Chain A, Phosphorylation Independent Interactions Between 14-3-3 And Exoenzyme S: From Structure To Pathogenesis, gi 161172139 pdb 2O02 B Chain B, Phosphorylation Independent Interactions Between 14-3-3 And Exoenzyme S: From Structure To Pathogenesis	gi 161172138 (+5)	0.9	4.72	4.99
collagen binding protein 2 [Homo sapiens]	gi 1199487 (+1)	0.8	6.97	8.62
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A [Homo sapiens], gi 74136179 ref NP_001027981.1 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A [Macaca mulatta], gi 114613184 ref XP_001148412.1 PREDICTED: hypothetical protein LOC463386 isoform 7 [Pan troglodytes], gi 114613	gi 10863927 (+5)	0.8	5.2	6.93
caldesmon 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119604232 (+15)	0.8	2.71	3.29
voltage-dependent anion channel 2, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119574955 gb EAW54570.1 voltage-dependent anion channel 2, isoform CRA_a [Homo sapiens], gi 119574956 gb EAW54571.1 voltage-dependent anion channel 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]	gi 119574954 (+8)	0.8	1.24	1.49
Unknown (protein for IMAGE:3906970) [Homo sapiens]	gi 15928913 (+2)	0.8	1.18	1.49
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]	gi 31645 (+2)	0.7	19.21	27.19
tubulin alpha-1C chain [Homo sapiens], gi 20455322 sp Q9BQE3.1 TBA1C_HUMAN RecName: Full=Tubulin alpha-1C chain; AltName: Full=Alpha-tubulin 6; AltName: Full=Tubulin alpha-6 chain, gi 13436317 gb AAH04949.1 Tubulin, alpha 1c [Homo sapiens], gi 13543589 g	gi 14389309 (+3)	0.7	20.62	27.76
PRO2619 [Homo sapiens], gi 119626076 gb EAX05671.1 albumin, isoform CRA_m [Homo sapiens]	gi 11493459 (+22)	0.7	34.88	48.67

collagen alpha-1(VI) chain precursor [Homo sapiens], gi 125987811 sp P12109.3 CO6A1_HUMAN RecName: Full=Collagen alpha-1(VI) chain; Flags: Precursor, gi 30851190 gb AAH52575.1 Collagen, type VI, alpha 1 [Homo sapiens], gi 119629727 gb EAX09322.1 collage	gi 87196339	0.7	0.75	1.11
histone H2A type 1-A [Homo sapiens], gi 55625964 ref XP_518282.1 PREDICTED: histone H2A type 1-A-like [Pan troglodytes], gi 74752099 sp Q96QV6.3 H2A1A_HUMAN RecName: Full=Histone H2A type 1-A; AltName: Full=Histone H2A/r, gi 15020499 emb CAC44614.1 hist	gi 25092737 (+2)	0.6	12.85	21.01
peroxiredoxin-1 [Homo sapiens], gi 32455264 ref NP_859047.1 peroxiredoxin-1 [Homo sapiens], gi 32455266 ref NP_859048.1 peroxiredoxin-1 [Homo sapiens], gi 320461711 ref NP_001189360.1 peroxiredoxin-1 [Homo sapiens], gi 55586231 ref XP_513123.1 PREDICT	gi 4505591	0.6	7.32	11.3
RecName: Full=UMP-CMP kinase; AltName: Full=Cytidine monophosphate kinase; AltName: Full=Cytidylate kinase; AltName: Full=Deoxycytidylate kinase; AltName: Full=Uridine monophosphate kinase; AltName: Full=Uridine monophosphate/cytidine monophosphate kinase	gi 12644008 (+5)	0.6	0.87	1.49
RecName: Full=Triosephosphate isomerase; Short=TIM; AltName: Full=Triose-phosphate isomerase, gi 40889552 pdb 1R2R A Chain A, Crystal Structure Of Rabbit Muscle Triosephosphate Isomerase, gi 40889553 pdb 1R2R B Chain B, Crystal Structure Of Rabbit Muscle	gi 136066 (+8)	0.5	1.18	2.18
TPM4-ALK fusion oncoprotein type 2 [Homo sapiens]	gi 10441386 (+2)	0.4	2.47	5.51
TSA [Homo sapiens]	gi 1617118 (+4)	0.4	1.74	4.83
protein disulfide isomerase-related protein 5 [Homo sapiens]	gi 1710248 (+5)	0.4	0.83	2.36
Chain A, Human Muscle L-Lactate Dehydrogenase M Chain, Ternary Complex With Nadh And Oxamate, gi 13786850 pdb 1110 B Chain B, Human Muscle L- Lactate Dehydrogenase M Chain, Ternary Complex With Nadh And Oxamate, gi 13786851 pdb 1110 C Chain C, Human Muscle	gi 13786849 (+3)	0.3	4.22	13
Chain A, Structural And Electrophysiological Analysis Of Annexin V Mutants. Mutagenesis Of Human Annexin V, An In Vitro Voltage-Gated Calcium Channel, Provides Information About The Structural Features Of The Ion Pathway, The Voltage Sensor And The Ion Se	gi 157831404 (+3)	0.3	3.93	11.33
annexin A2, isoform CRA_c [Homo sapiens]	gi 119597993 (+5)	0.2	5.5	23.24
cofilin-1 [Homo sapiens], gi 57099669 ref XP_533231.1 PREDICTED: similar to Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform) (18 kDa phosphoprotein) (p18) isoform 1 [Canis familiaris], gi 114638608 ref XP_001170183.1 PREDICTED: cofilin-1 isoform 1 [Pan troglodyt	gi 5031635 (+1)	0.2	3.62	15.56
alpha-actinin-1 isoform a [Homo sapiens], gi 94982457 gb ABF50047.1 actinin alpha 1 isoform b [Homo sapiens]	gi 194097350 (+5)	0.2	1.74	11.32

Chain A, Crystal Structure Of Human Enolase 1, gi 203282368 pdb 3B97 B Chain B, Crystal Structure Of Human Enolase 1, gi 203282369 pdb 3B97 C Chain C, Crystal Structure Of Human Enolase 1, gi 203282370 pdb 3B97 D Chain D, Crystal Structure Of Human Enolase	gi 203282367 (+3)	0.2	1.83	11.07
Tubulin, beta [Homo sapiens]	gi 18088719 (+1)	0.2	2.23	10.11
annexin A1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119582950 (+3)	0.2	1.83	8.01
Chain A, Refined Solution Structure Of Human Profilin I	gi 157833469 (+3)	0.2	2.29	11.38
fibronectin 1, isoform CRA_h [Homo sapiens]	gi 119590943 (+7)	0.1	3.66	26.98
actin, beta [Homo sapiens]	gi 14250401 (+10)	0.1	3.05	24.22

Anexo 3. Proteínas identificadas no epitélio normal, estroma normal, tumor e estroma tumoral a partir de amostras microdissecadas a laser.

Epitélio normal	
Número de Acesso	Proteínas Identificadas (18)
gi 386803	40-kDa keratin protein [Homo sapiens]
gi 4502101	annexin A1 [Homo sapiens]
gi 494619	Chain I, The Refined 2.4 Angstroms X-Ray Crystal Structure Of Recombinant Human Stefin B In Complex With The Cysteine Proteinase Papain: A Novel Type Of Proteinase Inhibitor Interaction
gi 30313	cytokeratin 8 (279 AA) [Homo sapiens]
gi 51476390	hypothetical protein [Homo sapiens]
gi 386848	keratin [Homo sapiens]
gi 84040267	Keratin 6C [Homo sapiens]
gi 186685	keratin type 16 [Homo sapiens]
gi 28173564	keratin, type II cytoskeletal 73 [Homo sapiens]
gi 158261511	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 194384240	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 37848	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 34073	cytokeratin 4 (408 AA) [Homo sapiens]
gi 223130	fibrinogen betaB 1-118
gi 662841	heat shock protein 27 [Homo sapiens]
gi 34033	keratin 13 [Homo sapiens]
gi 114644568	PREDICTED: keratin 6A [Pan troglodytes]
gi 4506773	protein S100-A9 [Homo sapiens]
Estroma Normal	
Número de Acesso	Proteínas Identificadas (07)
gi 31645	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]
gi 33700	immunoglobulin lambda light chain [Homo sapiens]
gi 37848	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 189054178	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 29446	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 37403	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 34069	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 167887751	vimentin variant 3 [Homo sapiens]
Tumor	
Número de Acesso	Proteínas Identificadas (07)
gi 254839344	Chain A, Crystal Structure Of Human Alpha-Defensin 1 (Hnp1)
gi 31979	histone H2A.2 [Homo sapiens]
gi 386849	keratin type II [Homo sapiens]
gi 13273496	mutant hemoglobin beta chain [Homo sapiens]
gi 4506773	protein S100-A9 [Homo sapiens]
gi 29446	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 47115317	VIM [Homo sapiens]
Estroma Tumor	
Número de Acesso	Proteínas Identificadas (10)
gi 183801	alpha-globin [Homo sapiens]
gi 193244921	beta globin [Homo sapiens]
gi 229858	Chain A, Crystal Structure Of Defensin Hnp-3, An Amphiphilic Dimer: Mechanisms Of Membrane Permeabilization

<u>gi 181402</u>	epidermal cytokeratin 2 [Homo sapiens]
<u>gi 223130</u>	fibrinogen betaB 1-118
<u>gi 386848</u>	keratin [Homo sapiens]
<u>gi 13273496</u>	mutant hemoglobin beta chain [Homo sapiens]
<u>gi 116283512</u>	Unknown (protein for MGC:35458) [Homo sapiens]
<u>gi 29446</u>	unnamed protein product [Homo sapiens]
<u>gi 189054178</u>	unnamed protein product [Homo sapiens]

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Genomics and proteomics approaches to the study of cancer-stroma interactions

Flávia C Rodrigues-Lisoni^{1,8}, Paulo Peitl Jr², Alessandra Vidotto¹, Giovana M Polachini¹, José V Maniglia³, Juliana Carmona-Raphe¹, Bianca R Cunha¹, Tiago Henrique¹, Caique F Souza^{1,4}, Rodrigo AP Teixeira², Erica E Fukuyama⁵, Pedro Michaluart Jr⁶, Marcos B de Carvalho⁷, Sonia M Oliani², Head and Neck Genome Project GENCAPO⁹, Eloiza H Tajara^{1,4*}

Abstract

Background: The development and progression of cancer depend on its genetic characteristics as well as on the interactions with its microenvironment. Understanding these interactions may contribute to diagnostic and prognostic evaluations and to the development of new cancer therapies. Aiming to investigate potential mechanisms by which the tumor microenvironment might contribute to a cancer phenotype, we evaluated soluble paracrine factors produced by stromal and neoplastic cells which may influence proliferation and gene and protein expression.

Methods: The study was carried out on the epithelial cancer cell line (Hep-2) and fibroblasts isolated from a primary oral cancer. We combined a conditioned-medium technique with subtraction hybridization approach, quantitative PCR and proteomics, in order to evaluate gene and protein expression influenced by soluble paracrine factors produced by stromal and neoplastic cells.

Results: We observed that conditioned medium from fibroblast cultures (FCM) inhibited proliferation and induced apoptosis in Hep-2 cells. In neoplastic cells, 41 genes and 5 proteins exhibited changes in expression levels in response to FCM and, in fibroblasts, 17 genes and 2 proteins showed down-regulation in response to conditioned medium from Hep-2 cells (HCM). Nine genes were selected and the expression results of 6 down-regulated genes (*ARID4A*, *CALR*, *GNB2L1*, *RNF10*, *SQSTM1*, *USP9X*) were validated by real time PCR.

Conclusions: A significant and common denominator in the results was the potential induction of signaling changes associated with immune or inflammatory response in the absence of a specific protein.

Background

Solid tumors are characterized by the presence of two major components: neoplastic cells and a specialized nonmalignant stroma in which they are immersed and are essential for their survival and proliferation. In carcinomas, a basement membrane is usually present between these components [1,2].

The tumor stroma is distinguished by an enrichment of microvessel density, abundance of endothelial cells and precursors, inflammatory cells including lymphocytes, neutrophils, macrophages, dendritic and mast cells, and a connective tissue with fibroblasts, myofibroblasts and

histiocytes responsible for remodeling and deposition of extracellular matrix (ECM) components - fibronectin, collagens, elastin, and glycosaminoglycans [2-4]. Although these cells are nonmalignant, they have a unique gene expression pattern, compared to stroma cells in normal tissues [5,6].

Substantial evidence indicates that the development and the progression of cancer not only depend on its genetic characteristics but also on interactions with its microenvironment [4,7,8]. In fact, tumor cells may alter the surrounding stroma through direct cell contact or via the secretion of paracrine soluble factors, inducing cell differentiation or extracellular matrix modifications [9]. In its turn, stromal cells may promote cancer progression and acquisition of invasiveness [10-12]. It is

* Correspondence: tajara@famerp.br

¹Department of Molecular Biology, School of Medicine (FAMERP), São José do Rio Preto, Brazil

possible that such interactions contribute to the neoplastic cell phenotype and behavior as observed during the normal development process and function of organs and tissues [13,14]. As Albini and Sporn (2008) appropriately propose, the microenvironment may be more than a partner but also an essential component of the cancer, and both should be considered as a functional whole [15].

In this context, inflammation and infection have gained special attention. Well known examples connecting infection-related or -unrelated chronic inflammation and increased risk for cancer development are described in the literature [16], and probably more than 15% of cancers are linked to these factors [17]. TNF- α and NF- κ B transcription factor should play a central role in this process, modulating transcription of genes encoding angiogenic and growth factors, inflammatory cytokines and anti-apoptotic proteins [16]. In fact, many inflammatory mediators may influence cell proliferation and tumor development, as demonstrated by our recent studies on annexin A1 [18-20].

Macrophages represent one of the main inflammatory regulators in tumor stroma and are responsible for proliferation, invasion and immunosuppressive signaling, with the production of angiogenic and growth factors, chemokines, cytokines and matrix metalloproteinases [21]. The key partners of macrophages in this network are fibroblasts, the so-called carcinoma-associated fibroblasts (CAFs), which significantly increase the growth of neoplastic or normal cells [22,23] and can enhance tumor engraftment and metastasis in animal models [24]. Recently, Hawsawi et al. (2008) [25] observed well-defined differences in gene expression and proteomic profiles between activated CAFs and fibroblasts from normal stroma, emphasizing their importance in the cancer process.

Regardless of the fact that they are easily identified by their morphology, specific cellular markers for fibroblasts remain unknown, presumably because of their large diversity [26]. In tumor stroma, fibroblasts present a phenotype similar to those associated with wound healing, with a large and euchromatic nucleus and prominent rough endoplasmic reticulum [27,28]. These signals mediating the transition of normal to reactive fibroblasts are still not completely defined.

Many studies have analyzed the role of fibroblasts in cancer initiation and progression. To address this issue, several approaches have been used, as co-culture of cancer cells and fibroblasts and cultures with conditioned medium, combined or not with *in vivo* experiments. The data have shown that these cells, similar to macrophages, overexpress chemokines, interleukines, growth factors and matrix metalloproteinases, promoting inflammatory responses and facilitating angiogenesis,

cancer-cell invasion and proliferation [29-31]. In head and neck cancer, for example, *in vitro* experiments have suggested that the presence of fibroblasts is essential for invasive features either because cancer cells express higher levels of matrix metalloproteinases in the presence of fibroblasts [32,33] or because cancer-associated fibroblasts themselves synthesize these proteins [34,35].

Much of the answer to the question of tumor-stroma interactions lies in the identity of ligands, receptors and effectors of signaling patterns expressed by stroma and tumor cells. Numerous growth factors, cytokines, chemokines, hormones, enzymes and cells responsible for their expression have been characterized but the cross-signaling between pathways in this complex network is far from solved [7,36]. Adding complexity to the scenario, the chemomechanical environment of the extracellular matrix may also act in concert with signaling pathways and affect the cancer process [37].

An important perspective in the study of tumor stroma is the potential use of the gene expression pattern of their cells for diagnostic or prognostic evaluation and as a target for therapy. Supporting this idea are the results from studies on outcome prediction and molecular marker analysis of the stroma [6,38], drugs targeting inflammatory cells [39] and mediators of angiogenesis [40,41].

In order to investigate potential mechanisms by which the tumor microenvironment might contribute to cancer phenotype, we asked whether soluble paracrine factors produced by stromal and neoplastic cells *in vitro* may influence proliferation, and gene and protein expression. For these purposes, we exploited purified fibroblasts isolated from a primary oral cancer and an epithelial cancer cell line linked by conditioned medium and genomic and proteomic approaches. Both cells were treated with the conditioned medium of each other and submitted to analysis by rapid subtraction hybridization methodology, two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Based on the results of the rapid subtraction hybridization (RaSH) approach, a comparative quantitative real-time PCR was performed to validate the expression of several genes, focusing on those involved in tumorigenesis and inflammation. The results pointed to the participation of several inflammatory mechanisms that might have biological significance in epithelial tumors.

Methods

Primary tumor samples

For conditioned medium experiments, a primary epidermoid (squamous cell) carcinoma of the retromolar area was obtained from a 49-year-old male patient, prior to radiation and/or chemotherapy. Twenty-four laryngeal and 23 oral tongue squamous cell carcinoma (SCC) samples from patients undergoing tumor resection were

used for gene expression analysis. All carcinoma samples were reviewed by senior pathologists and exhibited the presence of at least 70% tumor cells; the corresponding surgical margins were classified to be free of tumor cells.

The study protocol was approved by the National Committee of Ethics in Research (CONEP 1763/05, 18/05/2005), and informed consent was obtained from all patients enrolled.

Epithelial cancer cell line and primary tumor cell cultures

The Hep-2 cell line, originally established from an epidermoid carcinoma of the larynx (ATCC, Rockville, Maryland, USA), was seeded at a density of 1×10^6 cells/mL per 75 cm² culture flask (Corning, NY, USA) in medium MEM-Earle (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), pH 7.5, supplemented with 20% fetal calf serum (Cultilab), 1% non-essential amino acids, 0.1% antibiotic/antimycotic (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), and cultured at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂.

A primary carcinoma of retromolar area sample showing epithelium and adjacent connective tissues was rinsed multiple times with 100× antibiotic and antimycotic solutions (Invitrogen) and minced into 2-4 mm fragments. Single-cell suspensions were obtained by digestion at 37°C for 1 hour with 40 mg/mL collagenase type I (Sigma Chemical, St Louis, USA). After centrifugation, the cells were washed with PBS, resuspended in DMEM medium supplemented with 20% fetal calf serum (Cultilab), 2 mM glutamine (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Invitrogen), and 0.1% antibiotic/antimycotic (Invitrogen). The cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL per 75 cm² culture flasks (Corning) and cultured at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂. Cell medium was changed at 72 h intervals until the cells became confluent. Since fibroblasts were mixed with the epithelial tumor cells at the time of initial plating, fibroblasts were selected by plating the cells growing in medium supplemented with 20% serum for at least 3 weeks [42-44].

Preparation of conditioned medium

Conditioned medium (CM) was prepared from Hep-2 cell or tumor stromal fibroblast cultures showing 80% confluence. Twenty-four, 48 and 72 hours after medium replacement, the supernatant or conditioned medium (CM24, CM48 and CM72, respectively) from three replicates was aspirated and filtered through a 0.22 µm membrane (Millipore) to remove any cell debris and stored at -80°C. Before using, the CM was diluted 1:1 in complete medium. The dilution 1:1 and CM72 were chosen to maximize the chance of detecting a cell response to soluble factors. Optimization experiments showed that dilutions lower than 1:1 resulted in higher numbers of dead cells.

Hep-2 cell-conditioned medium is referred to as HCM and fibroblast-conditioned medium is referred to as FCM.

Growth curve

Hep-2 cells were seeded at a density of 5×10^4 cells in plastic 6-well plates in two sets of quadruplicates. Twenty-four hours later, when cells had already adhered, Hep-2 cultures were incubated with FCMs. One replica in each set was treated with self-conditioned medium and one replica was treated with complete medium.

Medium was replaced on day 4 and cell morphology was observed every day. After 1, 3, 5 and 7 days, cells were harvested and counted using a Neubauer hemocytometer. The same experiment was repeated twice.

Immunofluorescence analysis

The Hep-2 cell line or tumor stromal fibroblasts were grown in culture chambers (Nunc, Naperville, IL, USA) and, after 3 days, the chambers were carefully removed, and the slides with adherent cells were fixed in 4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde, 0.1 mol/L sodium phosphate buffer, pH 7.4, for 2 hours at 4°C. The slides were washed in the same buffer and incubated with 0.1% albumin bovine and 3% normal serum in PBS (PBSA) to block nonspecific binding. The cells were immunostained with primary mouse monoclonal antibodies (Ab) anti-vimentin (NCL-VIM-V9, Novocast, Benton Lane, Newcastle, UK) or anti-cytokeratin (M3515, antibodies to all types of cytokeratins; AE1-AE3; Dako, Carpinteria, CA, USA) diluted at 1:200 in 1% PBSA, followed by overnight incubation at 4°C. For negative controls, the cells were incubated with nonimmune mouse serum (1:200 working dilution; Sigma-Aldrich). After repeated washings in 1% PBS, a goat anti-mouse IgG (Fc fragment-specific, Dako, Glostrup, Denmark) antibody conjugated to FITC (1:50; British BioCell International, Cardiff, UK) was added, followed by 1 hour incubation at room temperature. Thus, the cells were washed thoroughly in PBS. Analysis was conducted using an Axioskop 2 light microscope (Zeiss, GR) equipped with a digital camera. Digital images were captured by using software AxioVision (Zeiss, GR).

Immunohistochemical analysis

Apoptosis was assayed using AnxA5 staining as described [45]. Fixed Hep-2 cell line or tumor stromal fibroblast in slides from culture chambers were incubated with the following reagents: 2.1% sodium citrate for 30 min at 96°C; 3% hydrogen peroxide for 15 min; 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich) diluted in 0.4% PBS for 15 min; non-specific binding sites were blocked with 10% albumin bovine (BSA) diluted in TBS (20 mM Tris

buffer in 0.9% NaCl, pH 8.2) for 30 min. The slides were then incubated overnight with a rabbit polyclonal antibody anti-AnxA5 (sc8300, Santa Cruz Biotechnology, California, USA), diluted 1:200. After repeated washings in 1% PBSA, a goat anti-rabbit IgG (Fc fragment specific) antibody conjugated to 5 nm colloidal gold particles (N24916, Invitrogen) was added. Silver enhancing solution (L24919, Invitrogen) was used to augment gold particle staining. At the end of the reaction, cells were washed thoroughly in distilled water, counterstained with haematoxylin and examined using an Axioskop2 microscope (ZEISS, GR).

RNA extraction for Rapid Subtraction Hybridization (RaSH) and real time PCR experiments

Hep-2 cells and stromal fibroblasts were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL per 75 cm² culture flasks in complete medium (controls) and in conditioned medium. Hep-2 cells and fibroblasts were cultured for 5 and 3 days, respectively, and harvested by addition of TRIzol Reagent, following treatment with DNase (Invitrogen). Total RNA from primary tumor samples was also extracted using TRIzol Reagent and treated with DNase. cDNA synthesis was performed using a High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described by the manufacturer.

RaSH

RaSH technique was performed as described by Jiang et al. (2000) [46]. Aliquots (20 µg) of total RNA from control cells (driver) or treated cells (tester) were used for double-stranded cDNA synthesis using standard protocols [47].

The cDNA was digested with MboI (Invitrogen) at 37°C for 3 h followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. The digested cDNAs were mixed with the adaptors XPDN-14 5'-CTGATCACTC-GAGA and XPDN-12 5'-GATCTCTCGAGT (Sigma Chemical, final concentration 20 µM) in 30 µl of 1× ligation buffer (Gibco BRL), heated at 55°C for 1 min, and cooled down to 14°C within 1 h. After adding 3 µl of T4 DNA ligase (5 U/µl) (Gibco, BRL), ligation was carried out overnight at 14°C. After phenol/chloroform extraction and ethanol/glycogen precipitation, the mixtures were diluted to 100 µl with TE buffer (10 mM Tris/1 mM EDTA); 40 µl of the mixtures were used for PCR amplification.

The PCR mixtures were set up using 10 µM XPDN-18 5'-CTGATCACTCGAGAGATC, 0.4 mM dNTPs, 10 × PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂ and 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen). Thermocycler conditions were one cycle at 72°C for 5 min, followed by 25 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min, ending in a final extension at 72°C for 3 min. Ten µg of purified

PCR product (tester) was digested with 20U XhoI (Invitrogen) followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation.

One-hundred nanograms of the tester cDNA were mixed with 5 µg of the driver cDNA in hybridization solution (0.5 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, SDS2% and 40% formamide) and, after heating at 95°C, incubated at 42°C for 48 h. After extraction and precipitation, the hybridization mixture (1 µg) was ligated with XhoI-digested pZero plasmid and transformed into competent bacteria. Bacterial colonies were picked and used as DNA template for PCR. Clones were sequenced using an automated DNA sequencer and sequence homologies were searched using the BLAST program [48]. Gene ontology (GO) annotation was used for the functional classification of up- and down-regulated genes [49].

Quantitative PCR

For validation experiments, cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL per 75 cm² culture flasks in two sets of quadruplicates. Twenty-four hours later, when cells had already adhered, Hep-2 culture replicas were treated with FCMs and fibroblast cultures were treated with HCMs. One replica in each set (control) was treated with self-conditioned medium. Hep-2 cells and fibroblasts were harvested after 5 and 3 days, respectively, and RNA was extracted as described above.

Nine differentially expressed genes were selected for validation by quantitative real time PCR experiments according to their direct or indirect involvement in tumorigenesis. Their expression was checked in treated samples relative to matched non-treated samples. One of these genes (*ARID4A*) was also selected for quantitative real time PCR validation in fresh tumor samples of 24 laryngeal SCC and in 23 oral tongue SCC relative to matched normal samples.

The primers were manually designed with: 19-23 bp length, 30-70% GC content and a short amplicon size (90-110 bp). Their sequences are available upon request. Real time PCR was performed in triplicate using a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Reaction mixture consisted of a 20 µl volume solution containing 10 µl of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 500 nM of each primer and 100 ng cDNA. The PCR conditions were 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95° for 15 s and 60° for 1 min. Melting curve analysis was performed for each gene to check the specificity and identity of the RT-PCR products.

For each primer set, the efficiency of the PCR reaction (linear equation: $y = \text{slope} + \text{intercept}$) was measured in triplicate on serial dilutions of the same cDNA sample. The PCR efficiency (E) was calculated by the formula $E = [10^{(-1/\text{slope})}]$ and ranged from 1.96 to 2.02 in the different assays.

Three control genes (*GAPDH*, *ACTB* and *TUBA6*) were used as internal standards. The relative expression ratio (fold change) of the target genes was calculated according to Pfaffl (2001) [50]. Statistical analysis was performed by a two-tailed unpaired *t* test using GraphPad prism software.

Proteomic analysis

Hep-2 cells and stromal fibroblasts were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL per 75 cm² culture flasks in complete medium and in conditioned medium, as described for RASH experiments. Hep-2 cells and fibroblasts were cultured for 5 and 3 days, respectively, and harvested by centrifugation at 3200 rpm for 5 min at 4°C. Cells were disrupted by sonication, proteins were isolated and two-dimensional electrophoresis (2-DE) was performed, as described by de Marqui et al. (2006) [51]. Briefly, isoelectric focusing was carried out in a IPGphor (GE Healthcare) using 13-cm immobilized pH 3-10 L gradient strips. Vertical 12.5% SDS-PAGE was performed in a SE 600 Ruby electrophoresis unit (GE Healthcare) and proteins were detected by Coomassie Blue staining. Differentially expressed proteins were excised from gel, destained, dried and in-gel tryptic-digested. Negative and positive control digests were performed on gel slices that contained no protein and on slices cut from a band of the molecular weight marker, respectively.

Samples were analyzed using MALDI Q-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Quadrupole Ion Filter - Time of Flight) Premier (Waters Corporation, Milford, MA, USA) mass spectrometer (MS/MS). Duplicate or triplicate runs of each sample were made to ensure an accurate analysis.

For protein identification, the resulting MS/MS data were interpreted by MASCOT software (MS/MS Ions Search) [52] and searched against the Mass Spectrometry Protein Sequence Database (MSDB). The UniProtKB/Swiss-Prot [53] database was used for the functional classification of up- and down- expressed proteins.

Data Handling and Statistical Analysis

Quantification of apoptotic cells was performed with a high magnification objective (×40) counting cells in 100 μm² areas and reported as mean ± SEM per group. Densitometric analysis for the immunofluorescence staining used an arbitrary scale ranging from 0 to 255 units. Statistical differences between groups were determined by analysis of variance followed, if significant, by the Bonferroni test.

Results

Stromal fibroblasts: selection and immunofluorescence analysis

Fetal calf serum concentration and culture time provided a simple method of selecting fibroblasts from a

primary carcinoma of retromolar area. Fibroblast cultures at passage 78 still showed spindle-shaped cells, which displayed the typical fibroblast markers, weak cytokeratin and intense vimentin immunoreactivity in cytoplasm, after immunofluorescence analysis (Figure 1B, E). Staining was obtained with both antibodies (cytokeratin and vimentin) in Hep-2 cells (Figure 1C, F). No labeling was detected in sections incubated with the control nonimmune mouse serum (Figure 1A, D).

Ultrastructural analysis showed that the stromal fibroblasts present large euchromatic nuclei, more granular endoplasmic reticulum, mitochondria and nucleoli than normal fibroblasts (data not shown). Therefore, the spontaneously immortalized cell line of fibroblasts retained the characteristics of stromal cells and may correspond to cancer-associated fibroblasts (CAF).

Conditioned medium inhibits proliferation and induces apoptosis

Growth curves of Hep-2 cells treated with FCM showed decreased proliferation (Figure 2). Growth inhibition was observed as early as day 1 and was statistically significant ($P < 0.05$) at day 3 and day 5.

The immunohistochemistry reaction with AnxA5 antibody showed the presence of gold particles on the cytoplasm of the Hep-2 apoptotic cells (Figure 3). The AnxA5 immunoreactivity was found more in the apoptotic process of Hep-2 cells incubated in FCM (56%) than in cells without the treatment (24%). Apoptotic cells displayed distinctive morphology, a notable decrease in the nuclear size, irregular shape and cytoplasmic blebbing.

Genes identified using the RaSH approach

A total of 81 clones from the Hep-2 cell line and fibroblast libraries were sequenced. In the Hep-2 cell line, forty-one genes exhibited changes in expression levels in response to FCM treatment (33 down- and 8 up-regulated) and, in fibroblasts, 17 genes showed down-regulation in response to HCM treatment. These genes are involved in response to stimulus, apoptosis, cell proliferation and differentiation, signal transduction, transcription, translation and transport (Table 1 and 2).

Real-time PCR validation of differentially expressed genes

Nine genes displaying down- (*ARID4A*, *CALR*, *GNB2L1*, *GPNUMB*, *RNF10*, *SQSTM1*, *USP9X*) or up-regulation (*DAP3*, *PRDX1*) in Hep-2 cells treated with FCM were selected and the expression data for six down-regulated genes (*ARID4A*, *CALR*, *GNB2L1*, *RNF10*, *SQSTM1*, *USP9X*) were confirmed by real time PCR (Figure 4A). Most results were, therefore, consistent with the RaSH data.

ARID4A expression was also analyzed in 24 pairs of tumor and matched normal tissues from laryngeal squamous cell carcinomas and in 23 pairs of tumor and matched normal tissues from oral tongue squamous cell carcinomas. *ARID4A* mRNA levels were decreased (≥ 2 -fold) in almost half of the squamous cell carcinomas samples (-1.04 to -6.9-fold change, 23 of 47 samples, i.e., 49%) and were increased in some of these samples (1.51 to 6.26-fold change, 7 of 47 samples, i.e., 15%) (Figure 4B). In contrast, no differences in transcript levels were observed between 17 of 47 samples (36%) and normal tissue. Therefore, similarly to the Hep-2 cell line, most

primary head and neck tumors (49%) showed down-regulation of *ARID4A* transcripts.

No differences were observed in respect to clinico-pathological features between samples presenting up- and down-regulation of *ARID4A* transcripts (Additional file 1).

Proteomics approach

Comparison between 2-DE patterns from treated cells and controls revealed approximately 80 spots with significant differences in intensity. Seven proteins (Figure 5) showing expression level changes in response

to CM treatment were identified by MALDI-Q-TOF-MS mass spectrometry (Additional file 2). Five proteins (alpha enolase, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C C1/C2, aldolase A, tubulin beta and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) were down-regulated in Hep-2 cell line treated with conditioned medium (FCM72) and two proteins (vimentin and actin) were underexpressed in fibroblasts treated with Hep-2 cell line conditioned medium (HCM72). These proteins are involved in transcription, growth control, response to stimulus, RNA processing, glycolysis, cell motion and membrane trafficking.

Discussion

The molecular crosstalk between neoplastic and the surrounding tissue induces several stromal changes, including neoangiogenesis and immune/inflammatory reaction, as well as new extracellular matrix formation and the activation of fibroblast-like cells, a process known as desmoplasia [54], [55]. Initially, the desmoplastic response was considered a barrier against tumor invasion, but there is growing evidence that desmoplasia is an unfavorable prognostic factor. For example, Sis et al. [56] suggested that desmoplasia is related to increased risks of regional metastases, poorly differentiated

Table 1 Information on biological processes based on Gene ontology

<i>Biological Process</i>	<i>Down-regulated genes</i>
Cell communication	
signal transduction	<i>FAS, SQSTM1, YWHAZ</i>
Transcription	<i>ARID4A, CALR, MYC, PARP1, RNF10, SQSTM1</i>
Translation	<i>AARS, RPLP0, RPS17, RPS23</i>
Apoptosis	<i>CALR</i>
induction	<i>FAS</i>
anti-apoptosis	<i>TPT1, YWHAZ</i>
Cell migration	<i>TMSB4X</i>
Cell cycle	<i>DYNC1H1, MYC, PSMC6</i>
Cell proliferation	
negative regulation	<i>GPNMB, LDOC1</i>
positive regulation	<i>MYC</i>
Developmental process	
epidermis development	<i>UGCG</i>
Response to stimulus	
defense response	
inflammatory response	<i>LTA4H</i>
response to stress	<i>EIF2AK1, SQSTM1</i>
response to oxidative stress	
response to external stimulus	<i>EIF2AK1</i>
Transport	<i>CALR, NDUF4A, SQSTM1</i>
Metabolic process	
protein metabolic process	<i>COX7C, OLA1, PARP1, SQSTM1, USP9X</i>
protein modification process	<i>GRPEL2, HSP90AB1, PPP2R2A, PRPF4B, USP48</i>
lipid metabolic process	<i>LTA4H, UGCG</i>
DNA repair	<i>PARP1</i>
RNA processing	<i>PRPF4B, SF3B1</i>
Cellular homeostasis	<i>CALR, MYC, RPS17</i>
No classification	<i>GNB2L1, RCN1</i>
Up-regulated genes	
Transcription	<i>ENO1</i>
Translation	<i>EIF1, TARS</i>
Apoptosis	<i>RTN3</i>
induction	<i>DAP3</i>
Cell proliferation	<i>PRDX1</i>
negative regulation	<i>ENO1</i>
Developmental process	
organ development	<i>PRDX1</i>
Response to stimulus	
response to stress	<i>EIF1, RTN3</i>
Metabolic process	<i>PRDX1</i>
protein metabolic process	
protein modification process	<i>P4HB</i>
nucleic acid metabolic process	
RNA processing	<i>USP39</i>

Top down- and up-regulated genes selected by RaSH in Hep-2 samples treated with FCM.

Table 2 Information on biological processes based on Gene Ontology

<i>Biological Process</i>	<i>Down-regulated genes</i>
Cell communication	
signal transduction	<i>S100A6, FN1</i>
Transcription	<i>FOSL1</i>
Translation	<i>RPL37A, RPL7, RPL19, RPL27A, RPLP0</i>
Apoptosis	<i>CTSB</i>
anti-apoptosis	<i>TPT1</i>
Cell adhesion	<i>FN1</i>
Cell proliferation	
positive regulation	<i>S100A6, FOSL1</i>
Developmental process	
organ development	
epidermis development	<i>COL1A1</i>
Response to stimulus	
defense response	<i>FOSL1</i>
response to stress	<i>FN1</i>
Transport	<i>ERGIC3, STX4</i>
Metabolic process	
protein metabolic process	<i>CTSB</i>
RNA processing	<i>PRPF3</i>
No classification	<i>CIZ1, POLE4</i>

Top down-regulated genes selected by RaSH in CAF samples treated with HCM.

primary tumors and lymphatic and venous invasion in colorectal carcinoma. Similar results were observed for head and neck squamous cell carcinomas, which show a high risk of neck recurrence in presence of a desmoplastic stromal pattern [57].

In the present study, we investigated the influence of soluble paracrine factors produced *in vitro* by stromal cells derived from an oral carcinoma and by a neoplastic epithelial cell line on proliferation and gene/protein expression. First, we noted that conditioned medium from stromal fibroblast cultures inhibited Hep-2 cell line proliferation and induced apoptosis, suggesting that factors secreted by fibroblasts include proteins that interfere in cell growth and death of neoplastic cells. In addition, using rapid subtraction hybridization and proteomic analysis, we identified gene products generated by stromal and neoplastic cells that may influence proliferation, differentiation and apoptosis, or drive response to stimulus.

Down-regulated genes in neoplastic cells treated with FCM are involved in signal transduction (*FAS, SQSTM1, YWHAZ*), transcription (*ARID4A, CALR, MYC, PARP1, RNF10, SQSTM1*), translation (*AARS, RPLP0, RPS17, RPS23*), apoptosis (*CALR, FAS, TPT1, YWHAZ*), cell migration (*TMSB4X, GNB2L1*), cell cycle and cell proliferation (*DYNC1H1, GPNMB, LDOC1, MYC, PSM*),

epidermis development (*UGCG*), response to stimulus (*EIF2AK1*, *LTA4H*, *SQSTM1*), transport (*CALR*, *NDUFA4*, *SQSTM1*) and different metabolic processes (*USP9X*). Up-regulated genes are also involved in transcription and translation (*ENO1*, *EIF1*, *TARS*), apoptosis (*DAP3*, *RTN3*), cell proliferation (*PRDX1*, *ENO1*), organ development (*PRDX1*), response to stress (*EIF1*, *RTN3*) and metabolic processes (*PRDX1*, *P4HB*, *USP39*).

In fibroblasts treated with HCM, the biological processes of down-regulated genes include signal transduction (*S100A6*, *FN1*), transcription and translation (*FOSL1*, *RPL37A*, *RPL7*, *RPL19*, *RPL27A*, *RPLP0*), apoptosis (*CTSB*, *TPT1*), cell proliferation (*S100A6*, *FOSL1*), epidermis development (*COL1A1*), response to stimulus (*FN1*, *FOSL1*), transport (*ERGIC3*, *STX4*) and protein and RNA metabolism (*CTSB*, *PRPF3*).

Figure 5 Enlarged 2-DE gels of proteins from conditioned medium-treated Hep-2 cells and stromal fibroblasts. Five proteins (arrows), tubulin beta (A-B), alpha enolase (C-D), aldolase A (E-F), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G-H) and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (I-J) were down-regulated in Hep-2 cell line treated with fibroblast conditioned medium (A, C, E, G and I) and two proteins (K-L), vimentin (arrow on left) and actin (arrow on right), were underexpressed in fibroblasts treated with Hep-2 cell line conditioned medium (K).

Two genes exhibited similar patterns in both cells (*RPLP0*, *TPT1*), which may indicate that the transcript levels are affected by soluble paracrine factors produced by either fibroblasts or neoplastic cells or by other *in vitro* conditions. Therefore, they may not be specific to interactions between stroma and tumor.

After literature analysis, nine genes (*ARID4A*, *CALR*, *GNB2L1*, *GPNMB*, *RNF10*, *SQSTM1*, *USP9X*, *PRDX1* and *DAP3*) showing potential involvement in signaling cascades related to tumorigenesis and/or stromal/tumor cell interactions were selected for validation by real-time RT-PCR using treated and non-treated cell lines. For six genes (*ARID4A*, *CALR*, *GNB2L1*, *RNF10*, *SQSTM1*, *USP9X*), the results were consistent with the RASH data. In almost half of the primary tumors analyzed, *ARID4A* transcripts also showed down-regulation, although no correlation with clinicopathological features was detected. These findings in primary tumors should reflect the complex network of a multi-cellular tissue, a situation contrasting with that of a neoplastic cell line cultured in medium conditioned by fibroblasts.

The product of *ARID4A* - AT rich interactive domain 4A (RBP1-like) - also known as *RBP1* or *RBBP1* gene, interacts with the tumor suppressor retinoblastoma (pRB) and histone-modifying complexes, repressing promoters of specific genes [58]. Röhl et al. [59] detected several genes, including *ARID4A*, overexpressed in astrocytes treated with medium conditioned by activated microglia, which protected them against stress conditions. Recently, Wu et al. [60] showed that *Arid4a*-deficient mice exhibit down-regulation of several homeobox genes and of the forkhead box gene *Foxp3*, which codes a transcription factor involved in the development and function of regulatory T cells [61]. These mice also show bone marrow failure with myelofibrosis and higher frequencies of hematologic malignancies, providing evidence that *ARID4A* functions as a tumor suppressor gene and its absence is permissive for the proliferation of connective tissue elements. The study of Perez et al. [62] added data on the role of this gene in cancer. These authors detected increased mRNA levels of *ARID4A* and *RB1* in normal human epidermal keratinocytes treated with arsenic and benzo [a]pyrene *in vitro*. Since these chemicals alter proliferation and inhibit differentiation of keratinocytes [63-65], the findings may indicate that up-regulation of *ARID4A* is negatively related to epithelial differentiation. Therefore, the potential modulation of this gene by paracrine factors produced by stromal fibroblasts may represent an attempt to promote differentiation of neoplastic epithelial cells and, at the same time, their proliferation.

Calreticulin (coded by *CALR* or *CRT* gene) is a calcium-binding protein of the endoplasmic reticulum with intracellular and extracellular functions related to

cellular adhesion, migration, and phagocytosis [66]. Calreticulin can be observed on the surface of stressed cells and, when bound to the plasma membrane of apoptotic cells, drives the phagocytosis by macrophages and dendritic cells [67]. In absence of this protein, the cells are not efficiently removed by phagocytes [68]. Recently, Nanney et al. [69] showed that calreticulin stimulates both migration and proliferation of keratinocytes and fibroblasts and apparently attracts monocytes and macrophages, suggesting its involvement in inflammatory response. Otherwise, fibroblasts underexpressing *CALR* exhibit weak adhesion and spreading [70]. Accordingly, Kypreou et al. [71] detected a correlation between calreticulin up-regulation and progression of fibrosis and also that TGF-beta, a contributing factor in fibrotic processes, up-regulated calreticulin in cultured human epithelial cells. In light of the data, we speculate that the low levels of this protein observed in treated Hep-2 cells inhibit proliferation, or represent a protective response of neoplastic cells to phagocytosis and antitumor immune process.

Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1 or Rack1 (coded by *GNB2L1* gene) is a cytosolic protein homologous to the beta subunit of G proteins, and contains seven WD repeats, which act as sites for protein-protein interactions. Binding partners of *GNB2L1* include protein kinase C, Src family kinases, components of the ERK pathway, cytokine and interferon receptors, beta integrins and many others. Many of these interactions are consistent with the participation of Rack1 in cell adhesion, movement and growth [72-75].

Sequestosome 1 or ubiquitin-binding protein p62 (coded by *SQSTM1* or *p60* or *p62* gene) is a 62-kDa protein that binds to the Src homology 2 (SH2) domain of p56^{lck} kinase in a phosphotyrosine-independent manner [76]. It has been suggested that p62 is a signaling adaptor which links different signal transduction pathways related to cell proliferation, differentiation and death, including NF- κ B pathway [77-82]. *SQSTM1* abnormal expression has been observed in hepatocellular, prostate and breast cancers [83-85] and is associated with poor outcomes in breast cancer [86].

Another gene down-regulated by fibroblast-conditioned medium is *USP9X* (ubiquitin specific peptidase 9, X-linked), also known as *DFFRX*, *FAF* or *FAM*. This gene is a member of the peptidase C19 family and encodes a protein similar to ubiquitin-specific proteases (USPs). These proteases regulate the production and recycling of ubiquitin and are critically involved in the control of cell growth, differentiation, and apoptosis [87]. Alteration of USPs may play an important role in the pathogenesis of cancer [88] and may exert distinct growth regulatory activities by acting as oncoproteins or

tumor suppressor proteins. Overexpression of certain USPs correlates with progression towards a more malignant phenotype in carcinoma of lung, kidney, breast and prostate [89,90].

RNF10 (ring finger protein 10) is the least known gene selected for validation. The product contains a ring finger motif, which is involved in protein-protein interactions and has been described in proteins implicated in many cellular processes such as signal transduction, transcriptional regulation, ubiquitination, and apoptosis [91,92].

With respect to proteomic analysis, few differences (mostly quantitative) between treated and non-treated cells were detected. Among the proteins differentially expressed, alpha-enolase, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C C1/C2, aldolase A, tubulin beta and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase were down-regulated in neoplastic cells treated with FCM and vimentin and actin were down-regulated in fibroblasts treated with HCM. These proteins, produced by neoplastic cells or fibroblasts, may affect tumorigenesis. For example, the glycolytic enzyme alpha-enolase and its enzymatically inactive isoform MBP-1 (*c-myc* promoter binding protein 1) are negative regulators for *MYC* expression [93,94]. *MYC* is one of the most frequently de-regulated oncogenes in cancer [95] and, in the absence of both enzymes, may become activated and accelerate tumor growth. Contrary to RaSH results, alpha enolase protein was observed underexpressed by proteomic analysis in treated Hep-2 cells, which may indicate a nonspecific finding or a post-transcriptional/posttranslational regulation of the RNA/enzyme.

Conclusions

Fibroblasts, as other cells in tumor microenvironments, need to maintain close communication with cancer cells, promoting proliferation, recruitment of inflammatory cells and acquisition of invasive characteristics. Similarly, cancer cells may influence stromal cells to generate a favorable and supportive environment, which would supply them with nutrients and factors necessary for developing the tumor and spreading of metastasis. In the present study, we observed both positive and negative effects exerted by fibroblasts on Hep-2 cells, favoring or not the former. A significant and common denominator in the results was the potential induction of signaling changes associated with immune or inflammatory response in the absence of a specific protein. In fact, *ARID4A* down-regulation is related to low levels of the transcript factor Foxp3 [60], which in turn is linked to immune responsiveness by targeting NF- κ B and CREB pathways [96]. The final effect is the inhibition of the inflammatory response and the cost is a permissive sign for fibroblast proliferation [60]. Down-regulation of

CARL also blocks the inflammatory response but has negative effects on stroma growth [69]. In presence of low levels of Rack1, again a deficient or altered inflammatory response may occur since Rack1 underexpression has already been related to the deregulation of cytokine production [97]. Similar results have been observed in p62-deficient mice, which exhibit abnormal control of NF- κ B activation and reduced inflammation in experimental conditions [98]. The opposite effect is expected for osteostatin underexpression because this protein has been observed as a negative regulator of macrophage inflammatory responses [99].

The complexity of the tumor microenvironment is immense and much information is still necessary for better understanding how the relationship between stroma and carcinoma cells can be used for diagnostic and prognostic evaluation and a target for therapy.

Additional file 1: Clinicopathological features of 24 patients with larynx SCC and of 23 patients with tongue SCC.

Additional file 2: Underexpressed proteins in Hep-2 cells and fibroblasts treated with conditioned medium from fibroblasts (FCM) and Hep-2 (HCM), respectively.

Acknowledgements

We acknowledge the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP (Grants 04/12054-9 and 06/60162-0), Rede Proteoma do Estado de São Paulo (Grant FAPESP 04/14846-0/FINEP 01.07.0290.00), The Ludwig Institute for Cancer Research, and the researcher fellowships from FAPESP (FCR-L) and Conselho Nacional de Pesquisas/CNPq (BHT, SMO).

The GENCAPO (Head and Neck Genome) Project authors are the following: Cury PM⁷, de Carvalho MB⁸, Dias-Neto E^{3,14}, Figueiredo DLA⁹, Fukuyama EE⁵, Góis-Filho JF⁵, Leopoldino AM¹⁵, Mamede RCM⁹, Michaluart-Junior P⁶, Moyses RA⁶, Nóbrega FG⁴, Nóbrega MP⁴, Nunes FD¹³, Ojopi EPB³, Serafini LN¹⁰, Severino P¹, Silva AMA⁸, Silva Jr WA¹¹, Silveira NJF¹⁶, Souza SCOM¹³, Tajara EH², Wunsch-Filho V¹², Amar A⁸, Bandeira CM⁴, Braconi MA⁴, Brandão LG⁶, Brandão RM¹¹, Canto AL⁴, Cerione M⁵, Cicco R⁵, Chagas MJ⁴, Chedid H⁸, Costa A¹², Cunha BR², Curioni OA⁸, Fortes CS¹², Franzi SA⁸, Frizzera APZ⁷, Gazito D⁸, Guimarães PEM⁶, Kaneto CM¹¹, López RVM¹², Macarenco R⁴, Magalhães MR⁸, Meneses C⁴, Mercante AMC⁸, Pinheiro DG¹¹, Polachini GM², Rapoport A⁸, Rodini CO¹³, Rodrigues-Lisoni FC², Rodrigues RV², Rossi L⁸, Santos ARD¹¹, Santos M⁸, Settani F⁵, Silva FAM¹⁵, Silva IT¹¹, Souza TB⁸, Stabenow E⁵, Takamori JT⁸, Valentim PJ⁵, Vidotto A², Xavier FCA¹³, Yamaguchi F⁵, Cominato ML⁵, Correa PMS⁴, Mendes GS⁵, Paiva R⁵, Ramos O⁶, Silva C⁶, Silva MJ⁵, Tarlá MVC¹¹ (also presented in <http://ctc.fmp.usp.br/clinicalgenomics/cp/group.asp>).

Affiliations: ¹Instituto de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, São Paulo; ²Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; ³Departamento e Instituto de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo; ⁴Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, São Paulo; ⁵Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, São Paulo; ⁶Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Faculdade de Medicina, USP, São Paulo; ⁷Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; ⁸Hospital Heliópolis, São Paulo; ⁹Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP; ¹⁰Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP; ¹¹Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP; ¹²Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, USP, São Paulo; ¹³Departamento de Estomatologia, Faculdade de Odontologia da

USP, São Paulo; ¹⁴Centro de Pesquisas do Hospital AC Camargo, São Paulo, ¹⁵Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP; ¹⁶Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, MG, Brazil.

Author details

¹Department of Molecular Biology, School of Medicine (FAMERP), São José do Rio Preto, Brazil. ²Department of Biology, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, Brazil. ³Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, School of Medicine (FAMERP), São José do Rio Preto, Brazil. ⁴Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil. ⁵Department of Head and Neck Surgery, Arnaldo Vieira de Carvalho Hospital, São Paulo, Brazil. ⁶Division of Head and Neck Surgery, Department of Surgery, School of Medicine (USP), São Paulo, Brazil. ⁷Department of Head and Neck Surgery, Heliópolis Hospital, São Paulo, Brazil. ⁸Department of Biology and Zootecny, Faculty of Engineering of Ilha Solteira (UNESP), Ilha Solteira, Brazil. ⁹Author list and addresses presented in the Acknowledgements.

Authors' contributions

FCR-L participated in the design of the study and analysis of the data, carried out cell culture, RaSH experiments and drafted the manuscript. PPJR helped with RaSH experiments. AV and GMP carried out proteomics analysis. JMM was responsible for sample collection and processing. JC-R carried out cloning and sequencing of the samples. BRC carried out cell culture experiments. TH helped with manuscript preparation. CFS performed the real time PCR experiments. RAPT and SMO carried out immunofluorescence and immunohistochemical analysis. EEF and PMJR carried out clinical data analysis for sample selection. MBdC carried out clinical data analysis for sample selection and drafted the manuscript. GENCAPO team members were responsible for sample collection and initial on-site sample processing, provided the pathological analysis of the cases, obtained the informed consent and discussed the findings. EHT participated in the study design and coordination, carried out the analysis and interpretation of the data and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 26 June 2009 Accepted: 4 May 2010 Published: 4 May 2010

References

- Kumar V FN, Abbas A: *Robbins & Cotran: Pathologic Basis of Disease* Philadelphia: Saunders 2004.
- Dvorak HF: Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986, **315**(26):1650-1659.
- Tlsty TD, Hein PW: Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 2001, **11**(1):54-59.
- Li H, Fan X, Houghton J: Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem* 2007, **101**(4):805-815.
- Zhao H, Ramos CF, Brooks JD, Peehl DM: Distinctive gene expression of prostatic stromal cells cultured from diseased versus normal tissues. *J Cell Physiol* 2007, **210**(1):111-121.
- Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, et al: Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 2008, **14**(5):518-527.
- Ao M, Franco OE, Park D, Raman D, Williams K, Hayward SW: Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium. *Cancer Res* 2007, **67**(9):4244-4253.
- Degen M, Brellier F, Kain R, Ruiz C, Terracciano L, Orend G, Chiquet-Ehrismann R: Tenascin-W is a novel marker for activated tumor stroma in low-grade human breast cancer and influences cell behavior. *Cancer Res* 2007, **67**(19):9169-9179.
- Micke P, Ostman A: Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* 2004, **45**(Suppl 2):S163-175.
- Zalatnai A: Molecular aspects of stromal-parenchymal interactions in malignant neoplasms. *Curr Mol Med* 2006, **6**(6):685-693.
- Kobayashi R, Deavers M, Patenia R, Rice-Stitt T, Halbe J, Gallardo S, Freedman RS: 14-3-3 zeta protein secreted by tumor associated monocytes/macrophages from ascites of epithelial ovarian cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2009, **58**(2):247-258.
- Pietras K, Pahl J, Bergers G, Hanahan D: Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med* 2008, **5**(1):e19.
- Mueller MM, Fusenig NE: Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(11):839-849.
- Quemener C, Gabison EE, Naimi B, Lescaille G, Bougateg F, Podgorniak MP, Labarchede G, Lebbe C, Calvo F, Menashi S, et al: Extracellular matrix metalloproteinase inducer up-regulates the urokinase-type plasminogen activator system promoting tumor cell invasion. *Cancer Res* 2007, **67**(1):9-15.
- Albini A, Sporn MB: The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 2007, **7**(2):139-147.
- Maeda S, Omata M: Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci* 2008, **99**(5):836-842.
- Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D: Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med* 2000, **248**(3):171-183.
- Rodrigues-Lisoni FC, Mehet DK, Peitl P Jr, John CD, da Silva Junior WA, Tajara E, Buckingham JC, Solito E: In vitro and in vivo studies on CCR10 regulation by Annexin A1. *FEBS Lett* 2006, **580**(5):1431-1438.
- Silistino-Souza R, Rodrigues-Lisoni FC, Cury PM, Maniglia JV, Raposo LS, Tajara EH, Christian HC, Oliani SM: Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. *Int J Cancer* 2007, **120**(12):2582-2589.
- Alves VA, Nonogaki S, Cury PM, Wunsch-Filho V, de Carvalho MB, Michaluart-Junior P, Moyses RA, Curioni OA, Figueiredo DL, Scapulatempo-Neto C, et al: Annexin A1 subcellular expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2008, **53**(6):715-727.
- Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A: Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2008, **18**(1):3-10.
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR: Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999, **59**(19):5002-5011.
- Orimo A, Weinberg RA: Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 2006, **5**(15):1597-1601.
- Elenbaas B, Weinberg RA: Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res* 2001, **264**(1):169-184.
- Hawawji NM, Ghebeh H, Hendrayani SF, Tulbah A, Al-Eid M, Al-Tweigeri T, Ajarim D, Alaiya A, Dermime S, Aboussekhra A: Breast carcinoma-associated fibroblasts and their counterparts display neoplastic-specific changes. *Cancer Res* 2008, **68**(8):2717-2725.
- Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, Rijn van de M, Botstein D, Brown PO: Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**(20):12877-12882.
- Kalluri R, Zeisberg M: Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(5):582-601.
- Eyden B: The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med* 2008, **12**(1):22-37.
- Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, et al: Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998, **94**(6):715-725.
- Sternlicht MD, Lochter A, Sympon CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ, Werb Z: The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 1999, **98**(2):137-146.
- Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Brilloff S, Walter J, Karnatz N, Lamszus K, Rogiers X, et al: Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *Am J Pathol* 2007, **171**(5):1608-1618.
- Bair EL, Massey CP, Tran NL, Borchers AH, Heimark RL, Cress AE, Bowden GT: Integrin- and cadherin-mediated induction of the matrix metalloproteinase matrilysin in cocultures of malignant oral squamous cell carcinoma cells and dermal fibroblasts. *Exp Cell Res* 2001, **270**(2):259-267.

33. Ikebe T, Nakayama H, Shinohara M, Shirasuna K: **NF-kappaB involvement in tumor-stroma interaction of squamous cell carcinoma.** *Oral Oncol* 2004, **40**(10):1048-1056.
34. Che ZM, Jung TH, Choi JH, Yoon do J, Jeong HJ, Lee EJ, Kim J: **Collagen-based co-culture for invasive study on cancer cells-fibroblasts interaction.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **346**(1):268-275.
35. Zhang W, Matrisian LM, Holmbeck K, Vick CC, Rosenthal EL: **Fibroblast-derived MT1-MMP promotes tumor progression in vitro and in vivo.** *BMC Cancer* 2006, **6**:52.
36. Kenny PA, Lee GY, Bissell MJ: **Targeting the tumor microenvironment.** *Front Biosci* 2007, **12**:3468-3474.
37. Suresh S: **Biomechanics and biophysics of cancer cells.** *Acta Biomater* 2007, **3**(4):413-438.
38. Halsted KC, Bowen KB, Bond L, Luman SE, Jorcyk CL, Fyffe WE, Kronz JD, Oxford JT: **Collagen alpha1(XI) in normal and malignant breast tissue.** *Mod Pathol* 2008, **21**(10):1246-1254.
39. Gough MJ, Ruby CE, Redmond WL, Dhungel B, Brown A, Weinberg AD: **OX40 agonist therapy enhances CD8 infiltration and decreases immune suppression in the tumor.** *Cancer Res* 2008, **68**(13):5206-5215.
40. Schneider BP, Sledge GW Jr: **Drug insight: VEGF as a therapeutic target for breast cancer.** *Nat Clin Pract Oncol* 2007, **4**(3):181-189.
41. Gettinger S: **Targeted therapy in advanced non-small-cell lung cancer.** *Semin Respir Crit Care Med* 2008, **29**(3):291-301.
42. Aidinis V, Carninci P, Armaka M, Witke W, Harokopos V, Pavelka N, Koczan D, Argyropoulos C, Thwin MM, Moller S, et al: **Cytoskeletal rearrangements in synovial fibroblasts as a novel pathophysiological determinant of modeled rheumatoid arthritis.** *PLoS Genet* 2005, **1**(4):e48.
43. Chen TR, Shaw MW: **Stable chromosome changes in human malignant melanoma.** *Cancer Res* 1973, **33**(9):2042-2047.
44. Miyamoto M, Sugawa H, Mori T, Hase K, Kuma K, Imura H: **Epidermal growth factor receptors on cultured neoplastic human thyroid cells and effects of epidermal growth factor and thyroid-stimulating hormone on their growth.** *Cancer Res* 1988, **48**(13):3652-3656.
45. Solito E, Kamal A, Russo-Marie F, Buckingham JC, Marullo S, Perretti M: **A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils.** *FASEB J* 2003, **17**(11):1544-1546.
46. Jiang H, Kang DC, Alexandre D, Fisher PB: **RAsh, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**(23):12684-12689.
47. Sambrook J, Russel DW: *Molecular Cloning: a laboratory manual* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3 2001.
48. BLAST. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>].
49. GeneOntology. [<http://www.geneontology.org>].
50. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9):e45.
51. de Marqui AB, Vidotto A, Polachini GM, Bellato Cde M, Cabral H, Leopoldino AM, de Gois Filho JF, Fukuyama EE, Settanni FA, Cury PM, et al: **Leubilization of proteins from human lymph node tissue and two-dimensional gel storage.** *J Biochem Mol Biol* 2006, **39**(2):216-222.
52. MASCOT. [http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS].
53. UniProtKB/Swiss-Prot. [<http://ca.expasy.org/sprot/>].
54. Ohtani H: **Pathophysiologic significance of host reactions in human cancer tissue: desmoplasia and tumor immunity.** *Tohoku J Exp Med* 1999, **187**(3):193-202.
55. De Wever O, Mareel M: **Role of tissue stroma in cancer cell invasion.** *J Pathol* 2003, **200**(4):429-447.
56. Sis B, Sarioglu S, Sokmen S, Sakar M, Kupelioglu A, Fuzun M: **Desmoplasia measured by computer assisted image analysis: an independent prognostic marker in colorectal carcinoma.** *J Clin Pathol* 2005, **58**(1):32-38.
57. Olsen KD, Caruso M, Foote RL, Stanley RJ, Lewis JE, Buskirk SJ, Frassica DA, DeSanto LW, O'Fallon WM, Hoverman VR: **Primary head and neck cancer. Histopathologic predictors of recurrence after neck dissection in patients with lymph node involvement.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994, **120**(12):1370-1374.
58. Hurst DR, Xie Y, Vaidya KS, Mehta A, Moore BP, Accavitti-Loper MA, Samant RS, Saxena R, Silveira AC, Welch DR: **Alterations of BRMS1-ARID4A interaction modify gene expression but still suppress metastasis in human breast cancer cells.** *J Biol Chem* 2008, **283**(12):7438-7444.
59. Rohl C, Armbrust E, Kolbe K, Lucius R, Maser E, Venz S, Gulden M: **Activated microglia modulate astroglial enzymes involved in oxidative and inflammatory stress and increase the resistance of astrocytes to oxidative stress in Vitro.** *Glia* 2008, **56**(10):1114-1126.
60. Wu MY, Eldin KW, Beaudet AL: **Identification of chromatin remodeling genes Arid4a and Arid4b as leukemia suppressor genes.** *J Natl Cancer Inst* 2008, **100**(17):1247-1259.
61. Zheng Y, Rudensky AY: **Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage.** *Nat Immunol* 2007, **8**(5):457-462.
62. Perez DS, Handa RJ, Yang RS, Campain JA: **Gene expression changes associated with altered growth and differentiation in benzo[a]pyrene or arsenic exposed normal human epidermal keratinocytes.** *J Appl Toxicol* 2008, **28**(4):491-508.
63. Perez DS, Armstrong-Lea L, Fox MH, Yang RS, Campain JA: **Arsenic and benzo[a]pyrene differentially alter the capacity for differentiation and growth properties of primary human epidermal keratinocytes.** *Toxicol Sci* 2003, **76**(2):280-290.
64. Reznikova TV, Phillips MA, Rice RH: **Arsenite suppresses Notch1 signaling in human keratinocytes.** *J Invest Dermatol* 2009, **129**(1):155-161.
65. Tse WP, Cheng CH, Che CT, Lin ZX: **Arsenic trioxide, arsenic pentoxide, and arsenic iodide inhibit human keratinocyte proliferation through the induction of apoptosis.** *J Pharmacol Exp Ther* 2008, **326**(2):388-394.
66. Johnson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P: **The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**(3):122-129.
67. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, et al: **Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death.** *Nat Med* 2007, **13**(1):54-61.
68. Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM: **Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective.** *J Leukoc Biol* 2006, **79**(5):896-903.
69. Nanney LB, Woodrell CD, Greives MR, Cardwell NL, Pollins AC, Bancroft TA, Chesser A, Michalak M, Rahman M, Siebert JW, et al: **Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects.** *Am J Pathol* 2008, **173**(3):610-630.
70. Szabo E, Papp S, Opas M: **Differential calreticulin expression affects focal contacts via the calmodulin/CaMK II pathway.** *J Cell Physiol* 2007, **213**(1):269-277.
71. Kypreou KP, Kavvadas P, Karamessinis P, Peroulis M, Alberti A, Sideras P, Psarras S, Capetanaki Y, Politis PK, Charonis AS: **Altered expression of calreticulin during the development of fibrosis.** *Proteomics* 2008, **8**(12):2407-2419.
72. Vomastek T, Iwanicki MP, Schaeffer HJ, Tarcsafalvi A, Parsons JT, Weber MJ: **RACK1 targets the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway to link integrin engagement with focal adhesion disassembly and cell motility.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**(23):8296-8305.
73. McCahill A, Warwicker J, Bolger GB, Houslay MD, Yarwood SJ: **The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms.** *Mol Pharmacol* 2002, **62**(6):1261-1273.
74. Doan AT, Huttenlocher A: **RACK1 regulates Src activity and modulates paxillin dynamics during cell migration.** *Exp Cell Res* 2007, **313**(12):2667-2679.
75. Mamidipudi V, Dhillon NK, Parman T, Miller LD, Lee KC, Cartwright CA: **RACK1 inhibits colonic cell growth by regulating Src activity at cell cycle checkpoints.** *Oncogene* 2007, **26**(20):2914-2924.
76. Joong I, Strominger JL, Shin J: **Molecular cloning of a phosphotyrosine-independent ligand of the p56lck SH2 domain.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**(12):5991-5995.
77. Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, Moscat J: **The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis.** *Cancer Cell* 2008, **13**(4):343-354.
78. Sanz L, Sanchez P, Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Moscat J: **The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation.** *EMBO J* 1999, **18**(11):3044-3053.
79. Sanz L, Diaz-Meco MT, Nakano H, Moscat J: **The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway.** *EMBO J* 2000, **19**(7):1576-1586.
80. Wooten MW, Seibenhener ML, Mamidipudi V, Diaz-Meco MT, Barker PA, Moscat J: **The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor.** *J Biol Chem* 2001, **276**(11):7709-7712.

81. Mamidipudi V, Li X, Wooten MW: Identification of interleukin 1 receptor-associated kinase as a conserved component in the p75-neurotrophin receptor activation of nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 2002, **277**(31):28010-28018.
82. Chang S, Kim JH, Shin J: p62 forms a ternary complex with PKCzeta and PAR-4 and antagonizes PAR-4-induced PKCzeta inhibition. *FEBS Lett* 2002, **510**(1-2):57-61.
83. Stumptner C, Heid H, Fuchsichler A, Hauser H, Mischinger HJ, Zatloukal K, Denk H: Analysis of intracytoplasmic hyaline bodies in a hepatocellular carcinoma. Demonstration of p62 as major constituent. *Am J Pathol* 1999, **154**(6):1701-1710.
84. Thompson HG, Harris JW, Wold BJ, Lin F, Brody JP: p62 overexpression in breast tumors and regulation by prostate-derived Ets factor in breast cancer cells. *Oncogene* 2003, **22**(15):2322-2333.
85. Kitamura H, Torigoe T, Asanuma H, Hisasue SI, Suzuki K, Tsukamoto T, Satoh M, Sato N: Cytosolic overexpression of p62 sequestosome 1 in neoplastic prostate tissue. *Histopathology* 2006, **48**(2):157-161.
86. Rolland P, Madjd Z, Durrant L, Ellis IO, Layfield R, Spendlove I: The ubiquitin-binding protein p62 is expressed in breast cancers showing features of aggressive disease. *Endocr Relat Cancer* 2007, **14**(1):73-80.
87. Rolen U, Kobzeva V, Gasparjan N, Ovaa H, Winberg G, Kisseljov F, Masucci MG: Activity profiling of deubiquitinating enzymes in cervical carcinoma biopsies and cell lines. *Mol Carcinog* 2006, **45**(4):260-269.
88. Dees EC, Orlowski RZ: Targeting the ubiquitin-proteasome pathway in breast cancer therapy. *Future Oncol* 2006, **2**(1):121-135.
89. Ovaa H, Kessler BM, Rolen U, Galardy PJ, Ploegh HL, Masucci MG: Activity-based ubiquitin-specific protease (USP) profiling of virus-infected and malignant human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**(8):2253-2258.
90. Deng S, Zhou H, Xiong R, Lu Y, Yan D, Xing T, Dong L, Tang E, Yang H: Over-expression of genes and proteins of ubiquitin specific peptidases (USPs) and proteasome subunits (PSs) in breast cancer tissue observed by the methods of RFDD-PCR and proteomics. *Breast Cancer Res Treat* 2007, **104**(1):21-30.
91. Borden KL: RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol* 2000, **295**(5):1103-1112.
92. Freemont PS: RING for destruction? *Curr Biol* 2000, **10**(2):R84-87.
93. Spencer CA, Groudine M: Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 1991, **56**:1-48.
94. Subramanian A, Miller DM: Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J Biol Chem* 2000, **275**(8):5958-5965.
95. Prochownik EV: c-Myc: linking transformation and genomic instability. *Curr Mol Med* 2008, **8**(6):446-458.
96. Grant C, Oh U, Fugo K, Takenouchi N, Griffith C, Yao K, Newhook TE, Ratner L, Jacobson S: Foxp3 represses retroviral transcription by targeting both NF-kappaB and CREB pathways. *PLoS Pathog* 2006, **2**(4):e33.
97. Racchi M, Sinforiani E, Govoni S, Marinovich M, Galli CL, Corsini E: RACK-1 expression and cytokine production in leukocytes obtained from AD patients. *Aging Clin Exp Res* 2006, **18**(2):153-157.
98. Moscat J, Diaz-Meco MT, Wooten MW: Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem Sci* 2007, **32**(2):95-100.
99. Ripoll VM, Irvine KM, Ravasi T, Sweet MJ, Hume DA: Gpnmb is induced in macrophages by IFN-gamma and lipopolysaccharide and acts as a feedback regulator of proinflammatory responses. *J Immunol* 2007, **178**(10):6557-6566.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1755-8794/3/14/prepub>

doi:10.1186/1755-8794-3-14

Cite this article as: Rodrigues-Lisoni et al.: Genomics and proteomics approaches to the study of cancer-stroma interactions. *BMC Medical Genomics* 2010 **3**:14.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit