Suzana Terumi Honda

Influência de fibroblastos de linfonodo axilar de pacientes com câncer de mama na expressão gênica de células mamárias malignas MDA-MB231 e MCF-7

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Oncologia
Orientadora:Prof. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira

São Paulo
2008

Dedico aos meus pais
pelo amor e compreensão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo, principalmente pela saúde que foi fundamental para que eu conseguisse realizar esse trabalho.

Aos meus pais Hideyte Honda e Mitie Honda, meus exemplos de vida, de caráter e luta, que possuem como meta principal em suas vidas, a formação e a felicidade de seus filhos. Muito obrigada por vocês participarem tão intensamente em minha vida.

Ao meu marido Leonardo Battaglia, meu eterno namorado, minha luz e inspiração, sempre ao meu lado, momentos de felicidade e tristeza, meu conselheiro, mostrou coragem e força no momento em que mais precisei.

A minha irmã querida Luciana Honda e meu irmãozinho Walter Honda, sempre presente nas horas que eu mais preciso, sempre buscando a harmonia e felicidade da nossa família.

A minha tia querida, Tacaco Ito, minha segunda mãe, sua humildade e a maneira simples com que lida a vida me faz ter grande admiração.

A Dra Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira, pela dedicação e orientação durante todas as etapas deste trabalho, pelos conselhos sempre muito valiosos e admiração pela qual se dedica com carinho a todos os pacientes e a vida acadêmica.

A Dra Mitzi Brentani, meus agradecimentos pela oportunidade de estudar num grupo de pesquisa em câncer de mama pela qual se dedica a tantos anos com tanto carinho e sabedoria.

A Dra Lucia Hirata Katayama, muito obrigada pelo privilégio da companhia diária no laboratório, tornando momentos muito simples em valiosos, pela força e presença no momento mais difícil que eu já tinha enfrentado em minha vida e pela amizade que a cada dia se consolida ainda mais.

Ao Dr Igor Snitkovisky, pelo qual tenho grande admiração e carinho. Um exemplo de humildade, sabedoria e carisma.

As minhas queridas amigas Cíntia Milani e Tânia Yoshimoto, amigas que sei que posso contar sempre, e momentos difíceis que passei, não poderia ser diferente, estavam ao meu lado.

A Dra Renata Sobral, minha eterna professora, hoje minha amiga, responsável por eu ter ingressado na pesquisa e na Oncologia Veterinária, uma amizade que vem se sedimentando a cada ano.

Dra Rosângela Portilho e Dra Patrícia Bortman muito obrigada pelos ensinamentos e pelo banco de fibroblastos que armazenaram durante seus estudos e com carinho deixaram para que outros pudessem dar seqüência a outros estudos que elas iniciaram.

A Márcia Salzeberger e Paulo DelVale muito obrigada pela amizade e ajuda principalmente na cultura de células.

A Dra Rosimeire Roela pelo carinho, paciência e ensinamentos

A Dra Natália Bromberg, Simone Vieira e Graziela Ravacci obrigada pela amizade, carinho e atenção.

A Dra Flávia Mangone, fica minha admiração pela descontração e alegria que trás em todos os lugares que passa, e pela fundamental contribuição para formatação dessa dissertação.

A Yuri Urata que apesar do pouco tempo que nos conhecemos, muito obrigada pelo apoio, amizade e carinho, que tem sido demonstrado através de atitudes no convívio diário.

Ao meu amigo Mateus Camargo Filho, obrigada pela amizade e sua indispensável ajuda nas reações de RT-PCR e análises estatísticas.

Aos amigos do grupo da mama, Leonardo Gomes, Adriana Trapé, Camila Máximo, Larissa, Laura e Simone.

A Srta Marcia Hayashi, pela ajuda nos ensaios de bancada e sempre disposta a ajudar.

A Dra Miriam Hatsue Honda Federico e a todos do grupo de pesquisa em câncer de cabeça e pescoço, Simone Maistro, Fátima Pasini, Lilian Barbeta, Karen Brunialti, Bruno Cadima, Karina Escobar, Leonardo, Camila Godoi, Juliana Yamaguchi.

Ao Dr Roger Chammas e a todos de seu grupo de adesão celular, Andréa, Mara, Patricia, Rafael, Silvina, Tarcisio, Guilherme, Lara e Renata

A Dra Shigueko e a todos do seu grupo de cultura celular.

Ao Dr Eduardo Lyra pela dedicação as suas pacientes e pela coleta do material biológico.

A Dra Helena Brentani do laboratório de bioinformática do Instituto Ludwig pelas análises estatísticas dos dados de *cDNA microarray* e a toda sua equipe, Diogo Patrão, César Henrique Torres e Luiz André Barreta pela paciência e dedicação.

A Sra Maria José Benevides, por sua atenção, paciência e carinho.

A Srta Elizangela Dias e Rosilene Arruda pela dedicação e atenção a todos que necessitam de ajuda, além da amizade proporcionada.

A Maria Cristina Grandal pela dedicação nas ilustrações desse trabalho.

Aos funcionários Jair, Willame e Ivonete pela dedicação que se atem nos seus trabalhos, proporcionando um local adequado para a realização desse trabalho.

A todas as mulheres que lutam contra o câncer de mama e que contribuíram para que esse trabalho pudesse ser desenvolvido, pela doação do material biológico.

A todos os proprietários das minhas “pacientes” caninas que pelo amor e carinho que tem pelos seus animais de estimação, depositam confiança e esperança, para que estes possam ter qualidade de vida.

A Capes e à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) muito pelo financiamento desse projeto.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas ii

Lista de Figuras xii

Lista de Tabelas xv

1. Introdução ..... **pág 01**

2. Objetivos ..... **pág 12**

3. Casuística e Métodos ..... **pág 14**
- **3.1** Casuística ..... **pág 15**
- **3.2** Métodos ..... **pág 16**
  - **3.2.1** Cultura de células ..... **pág 16**
  - **3.2.2** Extração de RNA total ..... **pág 23**
  - **3.2.3** *Pool* das amostras de linhagens mamárias na presença de fibroblastos ..... **pág 23**
  - **3.2.4** Tratamento com *DNAse* ..... **pág 24**
  - **3.2.5** Reação da transcriptase reversa para obtenção de CDNA ..... **pág 25**
  - **3.2.6** Tecnologia de *cDNA microarray* ..... **pág 26**
  - **3.2.7** Desenho dos primers ..... **pág 29**
  - **3.2.8** Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real ..... **pág 30**
  - **3.2.9** Genes de Referência ..... **pág 35**
- **3.3** Condições da reação de RT-PCR em Tempo Real ..... **pág 36**

4. Resultados ..... **pág 45**
- **4.1** ..... **pág 46**
  Expressão gênica diferencial de células MDA-MB231 na presença de fibroblastos de linfonodo de pacientes com câncer de mama determinada por ensaio de *cDNA microarray*
  - **4.1.1** ..... **pág 54**
    Influência de fibroblastos de linfonodos não comprometidos de pacientes com câncer de mama [MDA/FN(-) vs MDA] no perfil da expressão gênica de células MDA-MB231
  - **4.1.2** ..... **pág 61**
    Influência de fibroblastos de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama [MDA/FN(+) vs MDA] no perfil da expressão gênica de células MDA-MB231
  - **4.1.3** ..... **pág 68**
    Genes cuja expressão foi analisada por RT-PCR

5. Discussão ..... **pág 77**

6. Conclusões ..... **pág 91**

7. Referências ..... **pág 93**

Apêndice ..... **pág 101**

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	–	do Inglês *American Type Culture Collection*
Ca	–	carcinoma
cDNA	–	DNA complementar
cm^2	–	centímetros quadrados
CO_2	–	dióxido de carbono
ºC	–	graus Celsius
Cy3-dCTP	–	5-Amino-propargyl-2'-deoxycytina5'- trifosfato acoplado a corante fluorescente Cy3 (verde)
Cy5-dCTP	–	5-Amino-propargyl-2'-deoxycytina5'- trifosfato acoplado a corante fluorescente Cy5 (vermelho)
DEPEC	–	dietilpirocarbonato
DMEM	–	meio Dubelcco's Eagle's Modified
DMSO	–	dimetilsulfóxido
DNA	–	ácido desoxirribonucléico
dNTP	–	desoxiribonucleotídeos trifosfatos (desoxi-adenosina, desoxi-citidina, desoxi-guanosina e desoxi-timidina)
DTT	–	ditiotreitol
EDTA	–	ácido etileno diamino tetracético
EGF	–	fator de crescimento epidermal
EMA	–	antígeno de membrana epitelial
ER	–	receptor de estrógeno
ErbB2	–	homólogo 2 do oncogene viral de leucemia eritroblástica
f	–	do inglês fold
FGF	–	fator de crescimento de fibroblasto
FN(+)	–	fibroblasto de linfonodo axilar comprometido
FN(-)	–	fibroblasto de linfonodo axilar não comprometido
MDA/FN(+)	–	MDA-MB231 co-cultivada com fibroblasto de linfonodo axilar comprometido
MDA/FN(-)	–	MDA-MB231 co-cultivada com fibroblasto de linfonodo axilar comprometido
g	–	força da gravidade (aceleração centrípeta)
Hb4a	–	linhagem celular epitelial mamária humana derivada de mamoplastia imortalizada pela transfecção do antígeno T grande do vírus SV40
HGF	–	fator de crescimento de hepatócito
IGF-I	–	fator de crescimento insulina-símile-1
M	–	molar
MCF-7	–	linhagem celular epitelial mamária humana bem diferenciada derivada de efusão pleural de adenocarcinoma
MCF-10A	–	linhagem celular epitelial mamária humana normal
MDA-MB231	–	linhagem celular epitelial mamária humana derivada de efusão pleural de adenocarcinoma

MDA-MB435	–	linhagem celular epitelial mamária humana derivada de efusão pericárdica
MDA-MB436	–	linhagem celular epitelial mamária humana metastática
mg	–	miligrama
ml	–	mililitro
mM	–	milimolar
MMP	–	metaloprotease da matriz extracelular
NbF-1	–	linhagem de fibroblastos de próstata de rato
ng	–	nanogramas
nm	–	nanômetro
ORESTES	–	do Inglês Open Reading Frame Expressed sequence Tags
pb	–	pares de bases
PDGF-α	–	fator de crescimento plaquetário – alfa
PMP22	–	codifica proteina 22 da mielina periférica
PR	–	receptor de progesterona
RT-PCR	–	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA	–	ácido ribonucléico
RNAm	–	ácido ribonucléico mensageiro
rNTP	–	ácido ribonucléico ribossomal
rpm	–	rotações por minuto
RPMI	–	meio de cultura do Roswell Park Memorial Institute
RT	–	enzima Transcriptase Reversa
TGF-β	–	fator de crescimento transformante beta
TGF-α	–	fator de crescimento transformante alfa
TNM	–	do Inglês Tumor / Node / Metastatic
UI	–	Unidade internacional
UICC	–	International Union Against Cancer
UV	–	luz ultravioleta
µg	–	microgramas
µl	–	microlitros
µM	–	micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. ..... **pág 21**
Distribuição topográfica das células de câncer de mama (MDA-MB231 ou MCF-7) foram plaqueadas na placa e os fibroblastos plaqueados nos insertos, separados fisicamente por uma membrana porosa

Figura 2. ..... **pág 22**
Co-cultura com fibroblastos de linfonodos comprometidos com células mamárias MDA-MB231. A - representação da camada superior do plaqueamento (no inserto). B – representação da camada inferior do plaqueamento (na placa)

Figura 3. ..... **pág 25**
Gel de agarose demonstrando as bandas 18 e 28s após tratamento com a *Dnase* de RNA de células MDA-MB231 co-cultivadas com fibroblastos

Figura 4. ..... **pág 32**
Syber Green I onde o fluorocromo se intercala a qualquer molécula de dupla fita presente na reação

Figura 5. ..... **pág 33**
Representação da amplificação de moléculas de DNA na reação de RT- PCR em Tempo Real

Figura 6. ..... **pág 34**
O número de cópias geradas aumenta de forma exponencial, dobrando a cada ciclo da reação

Figura 7. ..... **pág 37**
Temperatura inicial para des naturação da fita de cDNA, seguida de uma temperatura menor para anelamento dos *primers* e aumento da temperatura para iniciar a extensão da molécula

Figura 8. ..... **pág 39**
Curva de desnaturação dos genes referência (RPLP0, PPIA e GUSB) apresentando um único pico, mostrando a especificidade da reação

Figura 9. ..... **pág 40**
Curva de eficiência dos genes endógenos RPLP0, PPIA e GUSB.

Figura 10. ..... **pág 42**
Média de estabilidade dos genes referência

Figura 11. ..... **pág 46**
Diagrama de Venn: Número de genes diferencialmente expressos em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodos não comprometidos (MDA.FN(-)/MDA) (n=155 genes) e de genes diferencialmente expressos em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo comprometido (MDA.FN(+)/MDA) (n=188 genes). Setenta e sete genes foram diferencialmente expressos em células MDA-MB231 co-cultivadas na presença de fibroblastos.

Figura 12. ..... **pág 60**
Agrupamento hierárquico não supervisionado de células MDA-MB231 após co-cultura com fibroblastos de linfonodo não comprometido e células MDA-MB231 cultivadas isoladamente

Figura 13. ..... **pág 67**
Agrupamento hierárquico não supervisionado de células MDA-MB231 após co-cultura com fibroblastos de linfonodo comprometido e células MDA-MB231 cultivadas isoladamente

Figura 14. ..... **pág 71**
Expressão gênica de células MDA-MB231 (MDA) cultivadas isoladamente (monocultura) ou co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo não comprometido (MDA.FN (-)/ MDA) (n=5) e comprometido (MDA.FN (+)/ MDA) (n=5). A expressão dos genes HNMT, IL6, PAK1 e PRSS11 foi verificada por *cDNA microarray* e RT-PCR

Figura 15. ..... **pág 72**
Expressão gênica de células MDA-MB231 (MDA) cultivadas isoladamente (monocultura) ou co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo não comprometido (MDA.FN (-)/ MDA) (n=5) e comprometido (MDA.FN (+)/ MDA) (n=5). A expressão dos genes FN3K, COMT, SOD2 e LCN2 foi verificada por *cDNA microarray* e RT-PCR

Figura 16. ..... **pág 73**
Expressão gênica de células MDA-MB231 (MDA) cultivadas isoladamente (monocultura) ou co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo não comprometido (MDA.FN (-)/ MDA) (n=5) e comprometido (MDA.FN (+)/ MDA) (n=5). A expressão dos genes HNMT, IL6, PAK1 e PRSS11 foi verificada por RT-PCR

Figura 17. ..... **pág 74**
Expressão gênica de células MDA-MB231 (MDA) cultivadas isoladamente (monocultura) ou co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo não comprometido (MDA.FN (-)/ MDA) (n=5) e comprometido (MDA.FN (+)/ MDA) (n=5). A expressão dos genes FN3K, COMT, SOD2 e LCN2 foi verificada por RT-PCR

Figura 18. ..... **pág 75**
Expressão gênica de células MCF-7 cultivadas isoladamente (monocultura) ou co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo não comprometido (MCF7.FN (-)/ MCF7) (n=3) e comprometido (MCF7.FN (+)/ MCF7) (n=3). A expressão dos genes HNMT, IL6, PAK1 e PRSS11 foi verificada por RT-PCR

Figura 19. ..... **pág 76**
Expressão gênica de células MCF-7 cultivadas isoladamente (monocultura) ou co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo não comprometido (MCF7.FN (-)/ MCF7) (n=3) e comprometido (MCF7.FN (+)/ MCF7) (n=3). A expressão dos genes FN3K, COMT, SOD2 e LCN2 foi verificada por RT-PCR

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 ..... **pág 16**
Dados das pacientes com câncer de mama utilizadas nesse estudo

Tabela 2 ..... **pág 30**
Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores de genes selecionados

Tabela 3 ..... **pág 38**
Temperatura de fusão ou *Melting Temperature* de todos os genes referência (RPLP0, PPIA e GUSB) e de interesse (HNMT, IL6, PAK1, PRSS11, FN3K, COMT, SOD2 e LCN2)

Tabela 4 ..... **pág 42**
Medida de estabilidade da expressão (M) dos genes de referência em amostras de células MDA-MB231 cultivadas isoladamente (a, b e c); células MDA-MB231 co-cultivadas com fibroblastos de linfonodos não comprometidos (1, 2, 3, 4 e 5) e comprometidos (6,7,8,9 e 10). MDA-MB231 (utilizada como célula referência)

Tabela 5 ..... **pág 43**
Medida de estabilidade da expressão (M) dos genes de referência em amostras de células MCF-7 cultivadas isoladamente (a, b e c); células MCF-7 co-cultivadas com fibroblastos de linfonodos não comprometidos (1,2 e 3) e comprometidos (4, 5 e 6). HB4A (utilizada como célula referência)

Tabela 6 ..... **pág 47**
Genes diferencialmente expressos em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo não comprometido [MDA.FN(-)] em comparação as células cultivadas isoladamente. Setenta e oito genes foram diferencialmente expressos exclusivamente em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo não comprometido

Tabela 7 ..... **pág 49**
Genes diferencialmente expressos em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo comprometido [MDA.FN(+)] em comparação as células cultivadas isoladamente. Cento e onze genes foram diferencialmente expressos exclusivamente em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo comprometido

Tabela 8 ..... **pág 52**
Genes diferencialmente expressos entre células MDA-MB231 co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo não comprometido [MDA.FN(-)] ou comprometido [MDA.FN(+)] em comparação às células MDA-MB231 cultivadas isoladamente. Setenta e sete genes foram comumente modulados em células MDA-MB231 na presença de fibroblastos

Tabela 9 ..... **pág 55**
Cento e cinqüenta e cinco genes foram diferencialmente expressos em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo não comprometido.

Tabela 10 ..... **pág 59**
Categorias funcionais (processos biológicos) moduladas em células MDA-MB231 na presença de fibroblastos de linfonodo não comprometido

Tabela 11 ..... **pág 61**
Cento e oitenta e oito genes foram diferencialmente expressos em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo comprometido

Tabela 12 ..... **pág 66**
Categorias funcionais (processos biológicos) moduladas em células MDA-MB231 na presença de fibroblastos de linfonodo comprometido

Tabela 13 ..... **pág 70**
Correlação da expressão gênica avaliada por *cDNA microarray* ou RT-PCR em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos ou cultivadas isoladamente

RESUMO

Honda ST. Influência de fibroblastos de linfonodo axilar de pacientes com câncer de mama na expressão gênica de células mamárias malignas MDA-MB231 e MCF-7. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 129p

O comportamento do câncer de mama pode ser influenciado pela interação entre células tumorais e estromais que infiltram e circundam o tumor. Acredita-se também que as células que compõem o microambiente linfonodal possam influenciar o perfil da expressão gênica de células mamárias malignas MDA-MB231, induzindo ou inibindo o desenvolvimento de metástase regional. Para avaliar essa possibilidade, células MDA-MB231 foram co-cultivadas com fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos ou não comprometidos de pacientes com câncer de mama, separadas por membranas porosas por 72 horas. O perfil da expressão gênica foi avaliado através de uma plataforma de *cDNA microarray* de 4608 genes. Observamos que 155 e 188 genes foram modulados em células MDA-MB231 na presença de fibroblastos de linfonodos não comprometidos e comprometidos, respectivamente, quando comparados com células MDA-MB231 cultivadas isoladamente. Análise do agrupamento hierárquico não supervisionado utilizando os genes diferencialmente expressos revelou a presença de dois grupos, um constituído por células MDA-MB 231 em monocultura e outro por células mantidas em co-cultura com fibroblastos. *Splicing de RNAm*, via spliceossoma, ciclo celular e regulação da transcrição por promotores da RNA polimerase II, foram algumas funções moduladas em células MDA-MB231. A seguir novos ensaios de co-cultura foram realizados e a expressão de alguns genes foram analisados por RT-PCR. FN3K e COMT foram menos expressos em células MDA-MB231 na presença de fibroblastos de linfonodos, mas não em co-cultura com células MCF-7, nas quais apenas HTRA1 mostrou-se hipoexpresso em casos de co-cultura com fibroblastos. Esses resultados sugerem que a inter-relação entre células estromais e células tumorais são dependentes do subtipo do tumor, de fenótipo luminal ou basal.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Fibroblastos 3.Linfonodos 4.Expressão gênica 5.Análise de seqüência com séries de oligonucleotídeos 6.Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa 7.Células epiteliais 8.Técnicas de cocultura

ABSTRACT

HONDA ST. Influence of axillary lymph node fibroblasts from breast cancer patients in gene expression of malignant breast cells MDA-MB231 and MCF-7 [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2008. 129p

Breast cancer behavior may be influenced by interactions between cancer and stromal cells, which infiltrate and surround the tumor. It is also believed that cells within the lymph node microenvironment may influence the gene expression profile of breast cancer cells, stimulating or inhibiting regional metastasis development. To evaluate this possibility, breast cancer MDA-MB231 cells were co-cultured with fibroblasts obtained from involved or uninvolved lymph nodes from breast cancer patients, using a porous membrane, for 72 hours. Gene expression profile was evaluated through a cDNA microarray platform containing 4608 genes. MDA-MB231 cells had 155 and 188 genes modulated by the presence of fibroblasts from uninvolved or involved nodes, respectively, as compared to MDA-MB231 cells cultured alone. Unsupervised hierarchical clustering using the differentially expressed genes revealed the presence of two groups, one comprising MDA-MB231 cells cultured aloned and another one, MDA-MB231 cells co-cultured with fibroblasts. Nuclear mRNA splicing, via spliceosome, cell cycle, and regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, were functions regulated in co-cultured MDA-MB231 cells. New co-culture assays were performed and expression of a few genes was further evaluated by RT-PCR. FN3K and COMT were both down-regulated in MDA-MB231 cells in the presence of nodes’ fibroblasts, but not in co-cultured MCF7 cells, while HTRA1 was just down regulated in MCF7 co-cultured cells. These results suggest that the inter-relationship between stromal and cancer cells are dependent on the subtype of tumor, whether from luminal or basal-like phenotype.

Descriptors: 1.Breast neoplasms 2.Fibroblasts 3.Lymph nodes 4.Gene expression 5.Oligonucleotide array sequence analysis 6. Reverse transcriptase polymerase chain reaction 7.Epithelial cells 8.Coculture techniques

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama no mundo todo, incluindo o Brasil, é considerado um problema de saúde pública, sendo a primeira causa de morte por câncer em mulheres de países desenvolvidos (Ministério da Saúde; INCA; 2007). A alta mortalidade associada ao câncer de mama pode ser atribuída ao fato de que as células malignas podem invadir tecidos adjacentes e disseminar regionalmente ou à distância. A metástase representa a mais importante adversidade na progressão do carcinoma mamário, sendo que comprometimento linfonodal é considerado o fator prognóstico mais importante, relacionado a recidiva precoce e menor sobrevida, na ausência de doença à distância. Em estudos publicados de 1970 a 1986, a sobrevida de 10 anos de mulheres tratadas com mastectomia radical, na ausência de comprometimento nodal, ou presença de 1-3, ou mais de 4 linfonodos comprometidos, variou de 50-80%, 38-63% e13-27%, respectivamente. Além disso, uma forte correlação existe entre o envolvimento linfonodal e a presença de metástase à distância (Margolese *et al.*, 2000; Hellman e Harris, 2000). Apesar disto, 20-30% das pacientes com câncer de mama que não apresentam comprometimento linfonodal ao diagnóstico, desenvolvem metástase à distância (Fitzgibbons *et al.*, 2000).

Portanto, um dos fatores prognósticos mais importantes em câncer de mama é o comprometimento de linfonodos regionais. Apesar disto, pouco ainda se sabe sobre os fatores que determinam o envolvimento dos linfonodos, que possivelmente incluem a agressividade do clone tumoral e a interação do microambiente com a célula cancerosa. Deste modo, estudos indicam que tumores com prognósticos distintos apresentam características gênicas próprias. De acordo com esta teoria, o perfil de expressão gênica do tumor

primário é capaz de separar pacientes com doença indolente daquelas com doença agressiva (Sorlie *et al.* 2001, Van de Vijver *et al.*, 2002) e o desenvolvimento da metástase está determinado no genoma tumoral. Além disso, a analogia feita por Paget há mais de 100 anos sobre a "semente e o solo", sugerindo que para a célula tumoral (semente) atuar é necessário uma afinidade com o microambiente (solo) permanece uma hipótese válida para explicar que a metástase aconteça.

Além disso, existem dados que sugerem que a metástase linfonodal apresenta um perfil gênico distinto do tumor primário, capaz de segregar amostras provenientes de diferentes sítios (Feng *et al.*, 2007). Estes achados entretanto, não permitem determinar se a expressão destes genes é regulada por fatores intrínsecos tumorais ou fatores do microambiente linfonodal.

A metástase é um processo complexo que envolve inúmeras etapas, o qual resulta de interações entre células tumorais e o microambiente tecidual. No primeiro passo, as células perdem sua capacidade de adesão célula-célula devendo ser capazes de se desprender do tumor primário e invadir a matriz extracelular, migrar pelo estroma, induzir a formação de novos vasos sanguíneos e/ ou linfáticos (angiogênese) e as células tumorais podem então extravasar e algumas completam o processo metastático. Estas células tumorais podem invadir tecidos adjacentes (Lakhani, 1999), disseminar-se para linfonodos regionais ou para orgãos à distância como ossos, cérebro, fígado e pulmões, por via hematogênica.

Os linfonodos são orgãos encapsulados constituídos por tecido linfóide e que aparecem espalhados pelo corpo, sempre no trajeto de vasos linfáticos. Os linfonodos satélites e regionais recebem e filtram a linfa antes que esta atinja a

corrente sanguínea (Junqueira e Carneiro, 1995). Os carcinomas têm a capacidade de metastatizar inicialmente para linfonodos regionais, como por exemplo, o linfonodo axilar nos casos de câncer de mama. Acredita-se que as células que compõem o microambiente linfonodal possam exercer influência no perfil da expressão gênica das células cancerosas que o comprometem, por sua vez, induzindo ou inibindo o desenvolvimento da metástase regional (Hasebe *et al.*, 2000).

O microambiente é constituído por células estromais, representadas principalmente por fibroblastos e por proteínas da matriz extracelular. Os fibroblastos são responsáveis pela síntese, deposição, remodelação da matriz extracelular e quando associados às neoplasias conferem ao tumor uma consistência rígida conhecida como desmoplasia (Elenbaas e Weinberg, 2001, Micke e Ostman, 2005).

No estroma tumoral, os fibroblastos são reconhecidos por sua ação parácrina no processo de tumorigênese (Elenbaas e Weinberg, 2001, Bhowmick *et al.*, 2004 e Yashiro *et al.*, 2005, Kalluri e Zeisberg, 2006), podendo modificar o fenótipo de células epiteliais por contato direto célula-célula, através de fatores solúveis ou por modificação de componentes da matriz extracelular, além de serem importantes fontes de metaloproteases e participarem da síntese de colágeno tipo I, III, IV e V, laminina e fibronectina (Kalluri e Zeisberg, 2006). Estudos em câncer de mama, indicam que um estroma reativo pode modificar a composição de componentes da matriz extracelular aumentando a capacidade de angiogênese, número de células inflamatórias e fibroblastos que participam no processo interação estroma-tumor e conseqüentemente na tumorigênese (Micke e Ostman, 2004).

Acredita-se que mutações por si só, não são capazes de promover o desenvolvimento do câncer (Bissel e Hadisky, 2001) e que uma diferença entre células normais e transformadas seja o modo que elas interagem com o estroma adjacente. Neste caso, além de do clone epitelial maligno, o estroma pode apresentar características permissivas que predisponham para a progressão tumoral (Parrinello *et al.*, 2004). Alguns autores têm tentado estabelecer a importância dos componentes estromais no sítio primário do câncer de mama e sua relação com a evolução clínica da doença. Alguns autores demonstraram que a expressão de alguns genes relacionados à matriz extracelular podem classificar pacientes de acordo com o prognóstico (Bergamaschi *et al.*,2008 e Helleman *et al.*, 2008). West *et al.* (2005) demonstraram que a expressão de genes relacionados à matriz extracelular, vias de fatores de crescimento e via de WNT, em padrão similar ao de tumor solitário fibroso ou de fibromatose tipo desmóide, podem identificar pacientes com câncer de mama com prognóstico pobre ou favorável, respectivamente. Em outro estudo observou-se que tumores de evolução favorável apresentam hiperexpressão de um grupo de inibidores de proteases, e os de evolução sombria, alta expressão de integrinas e metalopeptidases, e baixa expressão de laminina (Bergamaschi *et al.*,2008). Além disso, estudo recente demonstra que o nível de expressão de FN1 (*Fibronectin 1*), LOX (*Lysil oxidase*), SPARC (*Secreted creted protein, acidic, cystein-rich*) e TIMP3 (*Tissue inhibitor of metalloproteinase 3*) associou-se à sobrevida livre de metástase à distância (Helleman *et al.*, 2008). Além disso, demonstrou-se que as próprias células estromais de sítio primário de pacientes com câncer de mama são alvo de alterações genéticas, isto é, perda de heterozigoze e mutações de P53, as

quais podem ter relação com o comprometimento linfonodal em tumores esporádicos (Patocs *et al.*, 2007). Todos esses estudos indicam a importância das células estromais no comportamento tumoral.

Uma maneira de estudar as interações funcionais entre células epiteliais e fibroblastos é através de co-cultura de células. Deste modo, Dong-Le Bourhis *et al.* (1997) relatam que fibroblastos oriundos de tecido mamário normal inibem a proliferação de células de câncer de mama MCF-7, mas não a proliferação de células mamárias imortalizadas. Entretanto, fibroblastos obtidos de tecido mamário canceroso não influenciam a proliferação destas duas linhagens epiteliais mamárias. Por outro lado, Shekhar *et al.* (2001) mostraram que fibroblastos normais derivados de mamoplastia inibem o crescimento de linhagens epiteliais mamárias normais, enquanto fibroblastos provenientes de câncer de mama induzem o seu crescimento. De acordo com este segundo relato, Lefebvre *et al.* (1995), demonstraram uma maior proliferação de linhagens de câncer de mama co-cultivadas com fibroblastos originários de câncer de mama, mas o mesmo não ocorreu com células epiteliais mamárias normais. Nestes trabalhos, pequenas diferenças relativas ao modo de co-cultura podem ter originado estas diferenças pois enquanto Dong-Le Bourhis *et al.* (1997) cultivaram os fibroblastos e as células epiteliais separados por membrana porosa, que permite a passagem de substâncias solúveis, mas elimina o contato direto entre elas, Shekhar *et al.* (2001) e Lefebvre *et al.* (1995) cultivaram as células em íntimo contato, indicando que estas condições (contato íntimo ou fatores solúveis) controlam de modo diverso a proliferação no tumor. Além disso, de modo geral, estes trabalhos sugerem que fibroblastos oriundos de tecido normal tendem a reduzir a proliferação de células epiteliais,

ao contrário de fibroblastos originários de tumor, que tendem a induzir a proliferação das células epiteliais.

Em sistema de cultura tridimensional, Bissell *et al.* (1999) demonstraram que a modulação de receptores de superfície, incluindo aqueles da matriz extracelular, pode gerar sinais que podem reverter as células epiteliais mamárias malignas a um comportamento e morfologia normais. Utilizando um modelo de co-cultura semelhante, Sadlonova *et al.* (2005) demonstraram que ambos os tipos de fibroblastos, isto é, derivados de tecido mamário normal ou derivados de tumor primário de mama, têm a capacidade de inibir a proliferação de células epiteliais mamárias pré-cancerosas. No entanto, os fibroblastos derivados de tecido mamário normal apresentaram uma capacidade inibitória maior que aqueles fibroblastos derivados do tumor, sugerindo que a habilidade dos fibroblastos na inibição de proliferação das células epiteliais é perdida durante a carcinogênese mamária.

Outra hipótese é que os fibroblastos promovam a invasão das células do carcinoma de mama. Baseado neste conceito, Wang *et al.* (2002) utilizando fibroblastos obtidos da pele em co-cultura com células epiteliais malignas MDA-MB231 mostraram um aumento da capacidade de invasão dessas últimas associada à produção de MMP-9, metaloprotease associada ao fenótipo invasivo.

Em outro modelo de co-culturas observou-se que somente algumas linhagens de câncer mamário têm a capacidade de invadir o esferóide de fibroblastos, fossem eles originados da pele ou do tumor. Além disso, demonstrou-se que fibroblastos obtidos de tumor apresentam características de miofibroblastos. Por outro lado, observou-se também que fibroblastos normais

co-cultivados com células epiteliais tumorais, apresentam menor expressão de RNAm de PMP22, que codifica uma proteína cuja expressão em fibroblastos correlaciona-se a parada de proliferação em G0, com papel potencial na interação heteróloga entre células tumorais e fibroblastos normais (Kunz-Shughart *et al.*,2001).

Em estudos animais, Camps *et al.* (1990) sugerem que a presença de fibroblastos é importante para o desenvolvimento do tumor ao mostrar que fibroblastos de próstata de rato, NbF-1, inoculados com células epiteliais, entre elas células de câncer de mama humano MDA-436, em camundongos imunossuprimidos, levam à formação de tumores, o que não acontece quando as células epiteliais são injetadas isoladamente. Outros autores demonstraram ainda que a injeção concomitante de células epiteliais malignas e fibroblastos senescentes em camundongos levaram à formação de tumores. Este fato pode ser atribuído à ação parácrina de fatores de crescimento secretados pelos fibroblastos (Krtolica *et al.*, 2001). Em um estudo muito interessante, Kuperwasser *et al.* (2004) mostraram que em camundongos imunossuprimidos NOD/SCID, o estabelecimento de microambiente a partir de fibroblastos humanos ativados propicia o desenvolvimento pleno de tecido mamário humano. Além disso, fibroblastos transformados que hiperexpressam fatores de crescimento como TGFβ e/ou HGF induzem a formação de tumores nesses animais, a partir da injeção de células epiteliais mamárias oriundas de mamoplastia. Estes dados sugerem que estes fibroblastos estimulam o desenvolvimento de células epiteliais neoplásicas ocultas (presentes no tecido mamário normal) em células malignas.

Também em modelo de xeno-enxerto, Orimo *et al.* (2005), usando camundongos imunodeficientes, mostrou maior crescimento tumoral naqueles onde células MCF-7 transfectadas com o oncogene RAS eram co-injetadas com fibroblastos extraídos de carcinomas mamários humanos (CAFs), em comparação àqueles co-injetados com fibroblastos obtidos de tecido mamário normal adjacente derivados das mesmos pacientes. Estes autores atribuíram esta indução do crescimento tumoral a uma elevada secreção de SDF-1 (Fator 1 derivado de célula estromal) pelos fibroblastos oriundos do tumor, o qual atua em carcinomas mamários humanos que expressam CXCR4. Estes CAFs ainda promovem angiogênese por recrutamento de células progenitoras endoteliais (EPCs) para dentro do carcinoma, efeito mediado, em parte, por SDF1.

Poucos autores avaliaram as características de fibroblastos de linfonodos e sua interação com as células do câncer de mama. LeBedis *et al.* (2002) realizaram cultura de células estromais de linfonodo de rato e observaram que o meio condicionado obtido causa um aumento da proliferação de linhagens celulares de câncer de mama, mas não de células epiteliais mamárias normais. Este efeito pode ser mediado por fatores de crescimento como IGF-I, EGF, HGF e PDGF-α, pois transcritos dos mesmos foram encontrados nas células estromais. Ainda neste contexto, Montel e colaboradores (2006) avaliaram a influência do microambiente linfonodal na expressão de alguns genes de células de câncer de mama, em modelo xenogênico. Após injeção de células tumorigênicas, selecionou-se uma sublinhagem proveniente de metástase linfonodal cuja expressão gênica apresentava particularidades em relação às células parentais mantidas em cultura, ou provenientes de metástase pulmonar.

Portanto, modelos *in vitro* e *in vivo* indicam que os fibroblastos influenciam a proliferação e invasão das células tumorais. Alguns autores avaliaram este aspecto no sítio do tumor primário, poucos abordaram esta interação nos linfonodos. Moléculas específicas, bem como vias de sinalizações intracelulares são pouco conhecidas e é possível que esta interação favoreça o desenvolvimento tumoral.

Logo, podemos hipotetizar que a proliferação de células tumorais e a expressão gênica podem ser influenciadas pelas seguintes situações: pela interação entre fibroblasto e célula tumoral, fatores solúveis derivados de fibroblastos ou sinalização intracelular originária de interações entre célula e matriz extracelular.

Santos (2006) do nosso grupo avaliou o perfil gênico de fibroblastos de linfonodos comprometidos e não comprometidos oriundos de pacientes com câncer de mama e observou que em ambas as condições, a expressão gênica foi semelhante. Benvenuti (2008) por sua vez, verificou que a presença de células tumorais da mama influenciam a expressão de alguns genes expressos pelos fibroblastos, sugerindo que fatores secretados pelas células do câncer de mama possam induzir respostas específicas em fibroblastos, como indução de expressão de MAP2K3 (*Mitogen-activated protein kinase 3*) e MBD3 (*Methyl-CpG-binding domain protein 3*).

Nossa proposta atual foi estudar a influência de fibroblastos de linfonodos não comprometidos e linfonodos comprometidos oriundas de pacientes com câncer de mama na expressão gênica de células MDA-MB231 e MCF-7.

Estas duas linhagens foram escolhidas, pois representam modelos distintos de câncer de mama. A linhagem celular epitelial MDA-MB231 é originada de efusão pleural de uma paciente caucasiana de 51 anos com carcinoma ductal invasivo de mama. Esta linhagem de morfologia estrelada expressa vimentina e caderina-11, receptor de fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento transformante alfa (TGF-α). É considerada uma célula "triplo negativo", pois não expressa ER, PR e ERbB2. Esta célula é conhecida pelo seu alto potencial metastático e por promover a formação de adenocarcinoma pobremente diferenciado de Grau III em camundongos imunossuprimidos (Pishvaian *et al.*,1999, Lacroix *et al.*, 2004).

A linhagem epitelial MCF-7 é originada de efusão pleural de uma paciente caucasiana de 69 anos com carcinoma ductal invasivo de mama. Estas células apresentam receptores de estrógeno e progesterona, E-caderina, zona ocludens, desmoplakin I/II, mas não apresentam vimentina e caderina-11 e não expressa ERbB2. Esta linhagem de morfologia fusiforme é considerada luminal e possui baixo grau de invasão em matrigel (Pishvaian *et al.*,1999, Lacroix *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a influência de fibroblastos de linfonodo axilar não comprometido e comprometido de pacientes com câncer de mama na expressão gênica de células mamárias malignas MDA-MB231 e MCF-7.

Objetivos específicos

1. Analisar a expressão gênica global de células malignas MDA-MB231 após co-cultura com fibroblastos obtidos de linfonodo não comprometido e comprometido pela técnica de *cDNA microarray.*

2. Confirmar a expressão gênica diferencial de alguns genes selecionados por RT-PCR em Tempo Real.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) e pela Comissão de Ética para Análise de projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) (Protocolo nº 627/06).

Foram utilizados fibroblastos de cultura primária de linfonodo de pacientes com câncer de mama e linhagens de células mamárias malignas. Esse banco de fibroblastos foi estabelecido pela Dra Rosângela P. C. Santos. Foram coletadas amostras de linfonodo axilar de pacientes submetidas à mastectomia ou ressecção conservadora da mama, acompanhadas de linfadenectomia, após a obtenção do consentimento livre e esclarecido das mesmas. Estas amostras foram coletadas pelo Dr. Eduardo Carneiro Lyra, mastologista do IBCC, durante o período de dezembro de 2002 a março de 2004. Foi realizada análise histopatológica das amostras de linfonodo incluídas neste estudo a qual confirmou o comprometimento ou não comprometimento dos linfonodos. O estadiamento clínico destas pacientes foi realizado baseando-se no sistema TNM (*Tumor/ Node / Metastase*), adotado pela "*American Joint Committee on Câncer",* AJCC. Este sistema agrupa diversos tipos tumorais de acordo com as seguintes características: 1- T = tamanho do tumor, 2 – N = envolvimento do linfonodo e 3 – M = Ocorrência de metástase à distância do tumor primário.

Para a realização dos ensaios de co-cultura foram selecionadas 10 amostras de fibroblastos de linfonodos axilares de pacientes com câncer de mama, sendo que 5 amostras eram de linfonodos não comprometidos e 5

amostras de linfonodos comprometidos por doença metastática, confirmados pelo histopatológico (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados das pacientes com câncer de mama utilizadas nesse estudo. Ca - Carcinoma, LN - Linfonodo; - Linfonodo negativo; + Linfonodo positivo; ER- Receptor de Estrógeno; PR- Receptor de Progesterona. (*) Amostras utilizadas em ensaios de *cDNA microarray*

Amostra	Idade	TNM	Tumor Primário	Linfonodo Comprometido	ER	PR	ErbB2
1N*	43	T2N0M0	Ca lobular invasivo	0/13	+	+	-
2N*	44	T2N0M0	Ca lobular invasivo	0/29	+	+	-
3N*	74	T1N0M0	Ca ductal invasivo	0/28	+	+	-
4N	42	T3N0M0	Ca ductal invasivo	0/22	+	+	-
5N	60	T2N0M0	Ca lobular invasivo	0/27	-	+	-
6T	40	T2N1M0	Ca ductal invasivo	2/19	+	+	-
7T	47	T2N1M0	Ca ductal invasivo	3/19	-	+	+
8T*	49	T1N2M0	Ca ductal invasivo	6/25	+	+	+
9T*	59	T2N3M0	Ca lobular invasivo	13/27	-	+	-
10T*	41	T2N3M0	Ca ductal invasivo	10/19	-	+	-

3.2 Métodos

3.2.1 Cultura de Células

Banco de cultura de fibroblastos

Realizou-se cultura primária de fibroblastos obtidos de linfonodo axilar humano de pacientes com câncer de mama, pela Dra Rosângela P. C. Santos (Santos, 2006) pelo método de explantes, e após a terceira passagem observou-se uma cultura homogênea de fibroblastos, verificada pela expressão positiva de vimentina e actina de músculo liso, marcadores específicos para fibroblastos, mas não de citoqueratina, os quais foram posteriormente

congelados e armazenados em nitrogênio líquido. Foram armazenados neste banco de células, fibroblastos derivados de cultura primária oriunda de linfonodos axilares não comprometidos e comprometidos de pacientes com câncer de mama.

Cultura primária de fibroblastos

Para este estudo, inicialmente foram descongelados os fibroblastos, centrifugou-se a ampola até então parcialmente descongelada a 2000 x g por 2 minutos, em seguida aspirou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspendido para lavagem com 10mL do meio de cultura DMEM (Dulbecco´s) (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA), 100 μg/ml de ampicilina (Furp, Guarulhos, Brasil), 100 μg/ml de estreptomicina (Furp, Guarulhos, Brasil) e 2,5 μg/ml de anfotericina B (Cristália, São Paulo, Brasil), centrifugou-se novamente a 2000 x g por 2 minutos. Após a retirada do sobrenadante foi ressuspendido o precipitado (célula) com o mesmo meio e transferiu-se para uma garrafa de cultura com 75 cm^2 de área (Corning Incorporated, NY, USA), num volume total 10 ml de meio de cultura As células foram mantidas em estufa a 37ºC e atmosfera constante de 5% de CO_2, sendo o meio trocado por aproximadamente cinco dias e tripsinizadas quando necessário para sua expansão ou congelamento, usando para cada ampola de 2 ml contendo 95% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA) e 5% de DMSO (Dimetilsulfóxido) (SIGMA, Saint Louis, USA) para um total de 1 x 10^6 células, com viabilidade acima de

95%. Estas ampolas foram estocadas por 24 horas em sistema para congelamento Nalgene™ Cryo (Nalgene Inc, USA) em freezer a -70°C e depois transferidas para um container de nitrogênio líquido, onde permaneceram até o uso. Os fibroblastos usados nos ensaios de co-cultura e RT-PCR foram somente aqueles que se encontravam entre a terceira e a décima quinta passagem de cultura celular, sendo que a passagem celular foi contada a cada tripsinização.

Cultura de linhagem celular mamária

As células de câncer de mama MCF-7 (utilizadas para realização de co-cultura com fibroblastos de linfonodo) foram adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*) (HTB-22) e cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA) acrescido com 10% de soro fetal bovino, inativado por calor (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA) 50µg/ml de ampicilina (Furp, Guarulhos, Brasil) e 100µg/ml de estreptomicina (Furp, Guarulhos, Brasil) mantidas em estufa a 37°C em atmosfera constante de 5% de CO_2.

As células de câncer de mama MDA-MB231 foram adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*) (HTB-26). Essa linhagem foi cultivada em meio de cultura Leibovitz's L-15 (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA) com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA), 100µg/ml de ampicilina (Furp, Guarulhos, Brasil) e 100µg/ml de estreptomicina (Furp, Guarulhos, Brasil) mantidas em estufa a 37°C na ausência de CO_2.

Co-cultura de fibroblastos e células epiteliais com insertos

Para a realização dos ensaios de co-cultura as células epiteliais foram semeadas em placas de 6 poços com 9,6 cm^2 de área/poço (Becton Dickison, Labware, USA). Foram plaqueadas 1,4 x 10^5 células epiteliais na superfície de cada poço (8 x 10^5 células epiteliais por placa), usando-se 3 mL de DMEM (Dulbecco´s) / Ham's F-12 (Cultilab), na proporção de 1:1, suplementado com soro de cavalo 5% (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA), 20 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF) (Sigma), 100 ng/mL de toxina colérica (Calbiochem), 0,01 mg/mL de insulina bovina (Sigma) e 500 ng/mL de hidrocortisona (Sigma), 100 μg/mL de ampicilina e 100 μg/mL de estreptomicina. Esse meio de cultura foi usado como padrão para todos os ensaios, tanto para células MDA-MB231 e MCF-7. Passadas 24 horas do plaqueamento inicial das células epiteliais, foram colocados dentro de cada poço, insertos com membranas de 4,2 cm^2 de área e poros de 0,4 μm (Becton Dickinson Labware, USA). Sobre a membrana destes insertos foram semeados os fibroblastos, numa proporção de 30% em relação ao número inicial de células epiteliais, usando-se 2,5 mL do mesmo meio enriquecido que foi utilizado para o plaqueamento das células epiteliais (Figura 1). As co-culturas foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera constante de 5% de CO_2 por um período de 72 horas. O aspecto celular do plaqueamento das células MDA-MB231 e fibroblastos podem ser observados na figura 2.

As células em co-cultura separadas por insertos foram recuperadas isoladamente, após 72 horas em cultura, pelo método de raspagem da superfície dos poços e da membrana dos insertos utilizando-se um *Cell*

scraper (Corning Incorporated, NY, USA) e Trizol® (Invitrogen, EUA). Inicialmente, acrescentou-se 200 µl do reagente a cada um dos insertos contendo fibroblastos, assim como aos poços da placa com as células epiteliais aderidas. As células foram recuperadas e o volume das células em Trizol®(Invitrogen, EUA colocado separadamente em tubos de 1,5 ml devidamente identificados. As amostras foram estocadas a -70°C para posterior extração do RNA total de ambos os tipos celulares.

No mesmo dia que foram plaqueadas as células epiteliais nos insertos, células MDA-MB231 e MCF-7 são semeadas em garrafas de 150 cm^2 de área (Corning Incorporated, NY, USA) um total de 1 x 10^6 de células, em meio DMEM (Dulbecco´s) / Ham's F-12 (Cultilab), na proporção de 1:1, suplementado com soro de cavalo 5% (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA), 20 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF) (Sigma), 100 ng/mL de toxina colérica (Calbiochem), 0,01 mg/mL de insulina bovina (Sigma) e 500 ng/mL de hidrocortisona (Sigma), 100 µg/mL de ampicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

Após o período de 72 horas, o meio é aspirado, lava-se com PBS gelado e utiliza-se o método de raspagem na garrafa utilizando-se um *Cell scraper* (Corning Incorporated, NY, USA) e Trizol® (Invitrogen, EUA). As células foram recuperadas e o volume das células em Trizol® colocado nas garrafas foi de 1,5 ml. As amostras foram estocadas a - 70°C para posterior extração do RNA total de ambas as linhagens de mama.

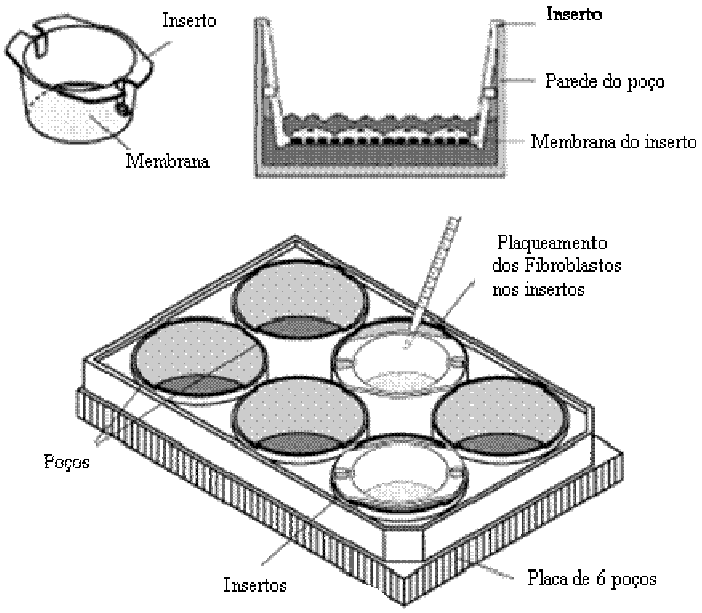


Figura 1. Distribuição topográfica das células de câncer de mama (MDA-MB231 ou MCF-7) foram plaqueadas na placa e os fibroblastos plaqueados nos insertos, separados fisicamente por uma membrana porosa

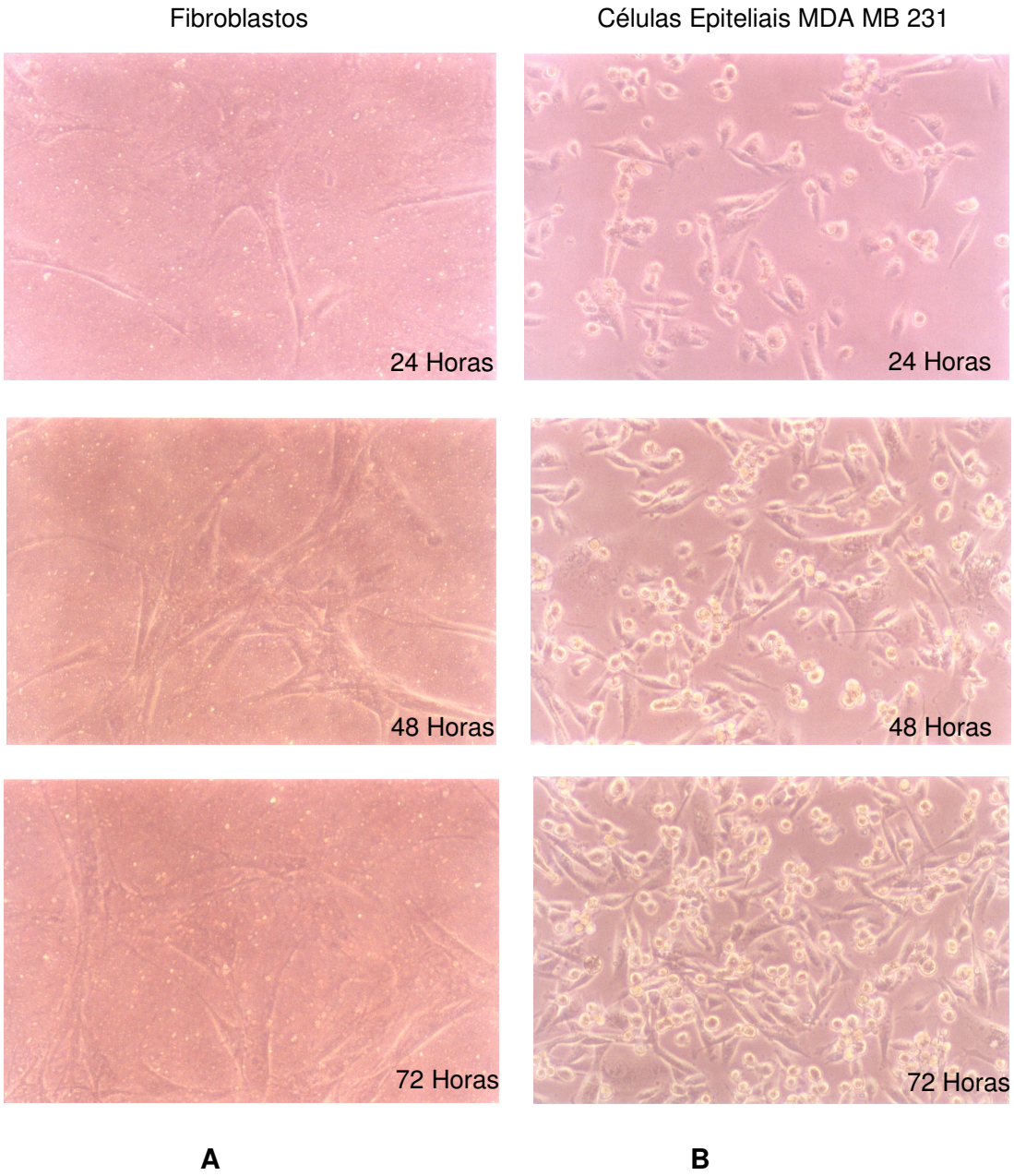


Figura 2. Co-cultura com fibroblastos de linfonodos comprometidos com células mamárias MDA-MB231. A - representação da camada superior do plaqueamento (no inserto). B – representação da camada inferior do plaqueamento (na placa)

3.2.2 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído pelo reagente Trizol (solução monofásica de fenol e isoticionato de guanidina) (Invitrogen, USA). Após o descongelamento da amostra, que estava armazenado no -70°C, foi adicionado 200 µl de clorofórmio (Nuclear, São Paulo, Brasil) e centrifugado a 12.000 g, 4°C por 15 minutos.

Recuperado o sobrenadante, foi acrescentado 500 µl de álcool isopropílico (Nuclear, São Paulo, Brasil), onde foi estocada a amostra no freezer -20°C, por um período aproximado de 18 horas Após esse período de precipitação, descongela-se a amostra, centrifuga-se a 12.000 g, 4°C por 15 minutos, o sobrenadante é desprezado e adiciona-se 1 ml de etanol a 75% para lavagem, e a amostra é novamente centrifugada a 12.000 g, 4°C por 15 minutos (repete-se 2 lavagens).

Após a secagem do *pellet,* este foi ressuspendido em 10 ou 20 µl de água DEPEC. Incubou-se por 10 minutos a 65º para permitir completa dissolução do RNA. A concentração de RNA foi determinada por comprimento de onda 260 e 280 nm em espectofotômetro Gene Quant pro (Amershan Biosciences, New Jersey, USA) e para avaliar a qualidade do RNA extraído, todas as amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1% e a integridade do RNA avaliando-se a relação entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28s/18s.

3.2.3 *Pool* das amostras de linhagens de mama MDA-MB231 e MCF-7 co-cultivadas com fibroblastos de linfonodos não comprometidos e comprometidos

Foram realizadas co-culturas de células MDA-MB231 com fibroblastos de linfonodos não comprometidos (n=5) e comprometidos (n=5) obtidos de diferentes pacientes sendo que 6 delas foram previamente analisadas por *cDNA microarray* (Tabela 1). O mesmo foi realizado para as células MCF-7, com a diferença de que o número de pacientes utilizados foi menor, fibroblastos de linfonodos não comprometidos (n=3) e comprometidos (n=3).

Na tentativa de minimizar os efeitos da cultura sob a expressão gênica de células MDA-MB231 e MCF-7, efetuamos 2-3 ensaios independentes (utilizando duas a três passagens consecutivas) de células de câncer de mama e fibroblastos. A seguir, efetuamos a combinação de iguais quantidades de RNA dessas células obtidas dos 2-3 ensaios, estabelecendo um *pool* de amostras de células MDA-MB231 e MCF-7 (as quais foram mantidas em co-cultura com fibroblastos de uma paciente específica).

Após a co-cultura das células mamárias malignas co-cultivadas com fibroblastos, obtivemos:

- 5 amostras de células MDA-MB231 e 3 amostras de células MCF-7 co-cultivadas com fibroblastos de linfonodos comprometidos
- 5 amostras de células MDA-MB231 e 3 amostras de células MCF-7 co-cultivadas com fibroblastos de linfonodos não comprometidos.
- 3 amostras da cultura de células MDA-MB231 e 3 amostras de células MCF-7 cultivadas isoladamente.

3.2.4 Tratamento com *Dnase*

Foi realizada o tratamento de todas as amostras de RNA com *a DNAse - Kit DNA-free* (Ambion INC,Texas,USA) .

Inicialmente foi estabelecido o volume total da reação, que pode variar de 10 a 100 µl, adiciona-se o volume da amostra (10-50 µg de RNA) em seguida o tampão que corresponde a 10% do volume total da reação e se necessário completar com a *Nuclease Free Water*. Foi adicionado 2 U/µl da enzima *DNAse* e incubado à 37°C por 30 minutos. Esse processo é repetido duas vezes e após esse período foi adicionado o inativador (20% do volume total da reação), a qual foi deixado a temperatura ambiente por 2 minutos, em seguida foi centrifugado a 10.000g por 1,5 minutos. Recuperado o sobrenadante, foi realizado a leitura por espectofotômetro Gene Quant pro (Amershan Biosciences, New Jersey, USA) e para avaliar a qualidade do RNA extraído, todas as amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1%. A verificação da integridade do RNA foi feita avaliando-se a relação entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28s/18s (Figura 3).

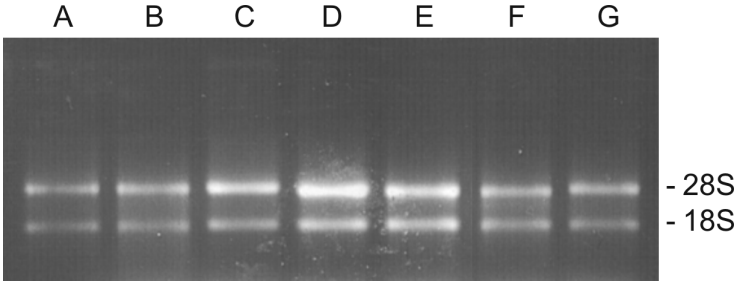


Figura 3. Gel de agarose demonstrando as bandas 18 e 28s após tratamento com a *Dnase* de RNA de células MDA-MB231 co-cultivadas com fibroblastos

3.2.5 Reação de Transcriptase Reversa para obtenção de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 4 µg de RNA diluído em água tratada com DEPEC (dietilpirocarbonato) para um total de 12µL. Adicionou 1µL de *primer* oligo dT (concentração inicial 0,5µg/µL)

(Invitrogen) e 1µL de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP´s) a 10mM (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA) A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos para desnaturação das fitas de RNA e posteriormente deixado no gelo por 1 minuto. Então foram acrescentados 4µL de tampão da Super Script III (Invitrogen) e 1µL de dietiltreitol (DTT) a 100mM (Invitrogen), e a mistura foi incubada a 55°C por 10 minutos. Após esse período acrescentou-se 1µL da enzima transcriptase reversa, a super script III (5UI/µL) (Invitrogen), incuba-se a reação a 55°C por 1 hora, para se obter a síntese da primeira fita de cDNA. Para inativação da enzima o tubo foi aquecido a uma temperatura de 70°C por 15 minutos. Após este procedimento, o cDNA foi estocado a -20°C, sua leitura foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 e 280nm (Gene Quant pro -Amersham Biosciences), esta leitura permitiu o cálculo da concentração do cDNA e posteriormente utilizado para RT-PCR em Tempo Real.

3.2.6 Tecnologia do *cDNA microarray*

Para a identificação em larga escala de genes diferencialmente expressos, foi utilizada a técnica de *microarray.*

As lâminas de *cDNA microarray* 4.8K002 foram construídas no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, sob a coordenação do Dr. Luiz Fernando Lima Reis, e são constituídas de 4.800 sequências imobilizadas sendo que 4.608 correspondem a clones de ORESTES (*Open Reading Frame Expressed Sequence Tags*) que representam genes humanos e que respeitam os seguintes critérios para inclusão: I) Clones de genes de sequências completas (full length); II) Clone com tamanho maior que 300 pares de bases com

seqüência de alta qualidade (conteúdo de CG); III) Clone que quando pesquisado no site: http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast resultou em gene com identidade maior que 85% em 100 pb; e IV) Clone com seqüência mais próximo da região 3'.

Os clones utilizados na lâmina são derivados de tecido de humano de tumor de mama, cólon, estômago e cabeça e pescoço. Dentre as sequências que apresentam funções conhecidas, foram categorizadas 505 classes funcionais distintas (processo biológico), sendo que 192 sequências referências foram incluídas como controle positivo ou negativo da hibridização. A plataforma e os dados da lâmina 4.8K002 de cDNA *microarray* foram depositadas no banco de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO), utilizando-se o formato MIAME, sob o número de acesso GPL 1930 *(www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo).*

As hibridizações das lâminas de *cDNA microarray* foram realizadas no Laboratório de Expressão Gênica do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, sob a coordenação da Dra Dirce Maria Carraro. Utilizou-se duplicata das amostras e RNA da célula Hb4a como referência.

Cada amostra foi hibridizada em duplicata utilizando o sistema inverso de incorporação de nucleotídeos conjugados a fluorocromos Cy3 (vermelho) e Cy5 (verde) (*Dye swap*).

Para as hibridizações das lâminas de *cDNA microarrays* foram utilizadas três amostras de RNAm amplificado independentes, isto é, três amostras de fibroblastos de linfonodos comprometidos ou três amostras de fibroblastos de linfonodos não comprometidos provenientes de pacientes diferentes. As amostras das células epiteliais malignas MDA-MB231 co-cultivadas com os

fibroblastos de linfonodos não comprometidos ou comprometidos foram às mesmas utilizadas nas co-culturas.

Análise matemática para seleção dos genes identificados como diferencialmente expressos por *cDNA microarray*

As análises de bioinformática foram executadas no Laboratório de Biologia Computacional do Hospital do Câncer A. C. Camargo, sob a coordenação da Dra. Helena Brentani.

Foram realizados ensaios para determinar a expressão gênica de células malignas em co-cultura com fibroblastos de linfonodos de seis pacientes com câncer de mama, sendo três provenientes de linfonodos comprometidos e três de linfonodos livres de doença.

1- Células MDA-MB231 mantidas isoladamente;

2-Células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodos não comprometidos;

3-Células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodos comprometidos

O teste t de *Student* foi utilizado para determinar o nível de significância da diferença da expressão gênica entre os grupos e como teste para correção de múltiplas análises, utilizou-se o FDR (*False Discovery Ratio)*. Foram considerados diferencialmente expressos aqueles genes cujos $p \leq 0,01$, FDRs $\leq 0,01$ e a variação de expressão ≥ 2 vezes entre os grupos analisados.

Os genes diferencialmente expressos foram classificados segundo suas categorias funcionais (processos biológicos) utilizando-se o programa *Onto Express* (*http://vortex.cs.wayne.edu/ontoexpress)* que leva em consideração

todas as sequências fixadas na lâmina de *cDNA microarray* com a mesma função (referência total). Funções diferencialmente moduladas foram aquelas com $p \leq 0,05$.

Foi realizada análise de agrupamento hierárquico não supervisionado utilizando-se a expressão diferencial dos genes e o grau de confiança foi testado pela técnica de *bootstrap* utilizando o programa TMEV.

3.2.7 Desenho dos *primers*

Todos os oligonucleotídeos iniciadores de interesse foram desenhados a partir da seqüência de RNAm do gene obtidos no site *www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide*. A escolha da região para confecção do oligonucleotídeo iniciador teve como primeiro critério incluir a região utilizada na lâmina de *microarray*, e como segundo critério ter grandes íntrons (regiões não codificadas presentes no DNA genômico) entre os exons (regiões codificadas presentes no DNA genômico e no transcrito de RNAm processado) de interesse contidos no DNA do gene. Deste modo objetivamos diminuir a chance de reação cruzada com o DNA genômico, pois a *DNA polimerase* utilizada não sintetiza fragmentos grandes (Invitrogen). A localização dos íntrons e exons foi analisada no endereço *Human Blat Search (genome.ucsc.Edu/cgi-bin/hgblat).* O terceiro critério e último critério foi que o produto tivesse por volta de 100-200pb, pois deste modo à reação de RT-PCR terá maior eficiência. A sequência dos oligonucleotideos diretos e indiretos forma obtidas a partir do programa *Primer 3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3 www.cgi)* (Tabela 2).

A homologia dos *primers* foi conferida no site *www.ncbi.nem.nih.gov/BLAST.* Para verificar possíveis formações de estruturas secundárias e homodímeros utilizou-se o programa *OligoTech.*

Tabela 2. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores de genes selecionados. pb (pares de bases) genes constitutivos(*)

Genes	"GeneBank"	Anotação	pb	Sequência dos Oligonucleotídeos
RPLP0*	NM_001002.3	Homo sapiens ribosomal protein, large, P0 (RPLP0)	149	Direto 5' GGCGACCTGGAAGTCCAACT3' Reverso 5' CCATCAGCACCACAGCCTTC3'
PPIA*	NM_021130.3	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA)	170	Direto 5' CAAATGCTGGACCCAACACA3' Reverso 5'TGCCATCCAACCACTCAGTC3'
GUSB*	NM_000181.2	Homo sapiens glucuronidase, beta (GUSB)	160	Direto 5' GGTTGGAGAGCTCATTTGGA3' Reverso 5' CCTGGTTTCATTGGCAATCT3'
HNMT	NM_006895.2	Homo sapiens histamine N-methyltransferase (HNMT)	181	Direto 5' GACATCCCAGCTACCCTGAA3' Reverso 5'TGTCCAGCATCTGAGTGAGG3'
IL6	NM_000600.2	Homo sapiens interleukin 6 (interferon, beta 2) (IL6)	153	Direto 5' CTGGTCTTTTGGAGTTTGAGG3' Reverso 5'CAGGGGTGGTTATTGCATCT3'
PAK1	NM_002576.3	Homo sapiens p21/Cdc42/ Rac1-activated kinase 1	117	Direto 5'TTCGAACCAGGTCATTCACA3' Reverso 5'TTGCTCTGCTCTGGGGTTAT3'
PRSS11	NM_002775.3	Homo sapiens HtrA serine peptidase 1 (HTRA1)	115	Direto 5 GGACTGTCCATTGATGCTGA '3' Reverso5'GGACTTCCCAGACGTGATCT 3'
FN3K	NM_022158.2	Homo sapiens fructosamine 3 kinase (FN3K)	163	Direto 5'TGAATGAGTGGCAGGATGAC3' Reverso 5'GGGACAATCTCTAGGCCACA3'
COMT	NM_007310.1	Homo sapiens catechol- O-methyltransferase (COMT)	151	Direto 5'ATCATCCCCCAGCTGAAGA3' Reverso 5'TCACGTTGTCAGCCAGTAGC3'
SOD2	NM_001024465.1	Homo sapiens superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2)	180	Direto 5'ACTGCTGGGGATTGATGTGT3' Reverso 5'TCTTGCTGGGATCATTAGGG3'
LCN2	NM_005564	Homo sapiens lipocalin 2 (LCN2)	174	Direto 5'CAAGGAGCTGACTTCGGAAC3' Reverso 5'GTCTCCCAGCTCCCTCAAT3'

3.2.8 Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real

A RT-PCR em Tempo Real é um dos métodos de maior sensibilidade e especificidade para a quantificação da expressão gênica. Uma técnica muito

utilizada para confirmar genes identificados do *cDNA microarray* (Wang *et al.*, 2006).

Segundo Pffafl *et al.* (2001), a quantificação relativa é considerada mais adequada para experimentos que investigam mudanças fisiológicas em níveis de expressão, onde utiliza-se, a razão de expressão entre um gene alvo e um gene de referência.

Utilizamos o sistema de detecção por *SYBR Green I* (Invitrogen, USA) que se baseia no uso de uma molécula fluorescente, denominada *SYBR GreenI,* que quando intercalada à dupla fita da DNA, emite fluorescência e então é possível quantificar o total de moléculas de DNA produzidas. Durante os ciclos iniciais da reação de RT-PCR, não há acúmulo de fitas duplas suficiente para que a fluorescência emitida possa ser detectada, então no decorrer dos ciclos da reação há o aumento do produto amplificado e conseqüentemente o aumento do sinal de emissão de fluorescência até que ultrapasse o sinal de fluorescência de fundo, passando então a ser detectável, sendo assim os valores quantificados depois de um número fixo de ciclos, que representa a quantidade final de cada produto acumulado.

A metodologia que utiliza o *SYBR Green I* (Invitrogen, USA) exige cuidadosa padronização, uma vez que este fluorocromo se intercala a qualquer molécula de dupla fita presente na reação. A especificidade da detecção de fluorescência com *SYBR Green I* pode ser comprometida pela formação de dímeros de oligonucleotídeos, pela concentração inadequada de oligonucleotídeos e pela formação de produtos inespecíficos de amplificação. Todos estes fatores levam à formação de

moléculas de dupla fita não esperadas, as quais incorporam o *SYBR Green I* e têm sua fluorescência registrada (Figura 4).

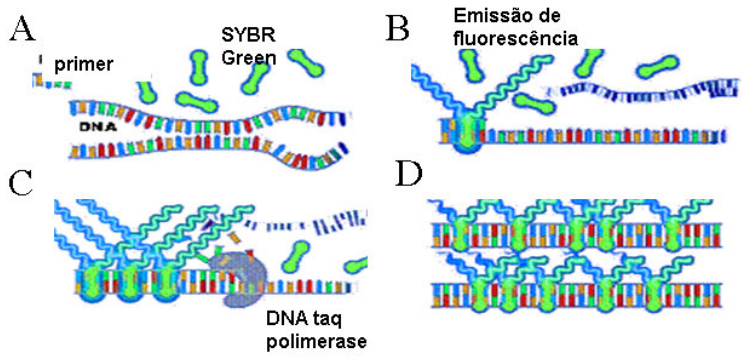


Figura 4. *Syber Green I* onde o fluorocromo se intercala a qualquer molécula de dupla fita presente na reação

Inicialmente, o sinal fluorescente aparece como uma linha plana horizontal, pois estará abaixo do limite de detecção do equipamento. Mas após os ciclos iniciais, obteve-se a curva de amplificação contendo três fases distintas que caracterizou a progressão da reação: fase exponencial, onde o sinal será detectado e aumentado de maneira diretamente proporcional ao aumento do produto da reação; uma fase linear logo em seguida, onde a inclinação da curva de amplificação diminui constantemente, e nesta fase alguns componentes da reação em cadeia polimerase diminuem e a eficiência da amplificação começou a diminuir; fase platô onde houve limitação dos reagentes, e foi onde a curva de amplificação alcança a fase platô (Figura 5).

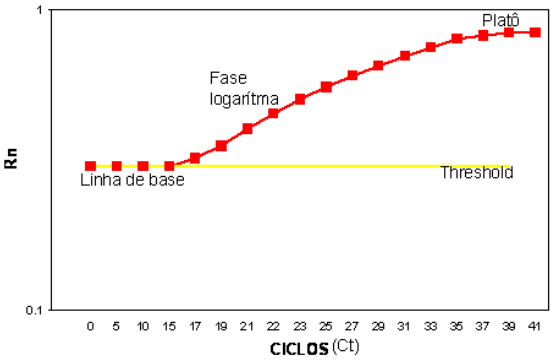


Figura 5. Representação da amplificação de moléculas de DNA na reação de RT-PCR em Tempo Real, onde observamos uma linha basal (não é possível identificar fluorescência pela pequena quantidade de amplificação), uma fase logarítmica (a quantidade de produto amplificado dobra a cada ciclo), uma fase linear (pequeno aumento de produto) e uma fase platô (não há mais amplificação do produto)

Neste método de detecção, a confirmação de especificidade da amplificação é realizada por meio de análise da curva de desnaturação ou *melting curve*. Nesta curva, analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de fusão ou *melting temperature* (Tm) de cada fragmento, resultante da reação de amplificação. Cada fragmento amplificado possui um Tm específico, o que permite a diferenciação entre os produtos resultantes.

Durante a reação, a fluorescência aumenta a cada novo ciclo e atinge um limiar (*threshold*), no qual todas as amostras podem ser comparadas. Este limiar corresponde ao momento utilizado para análise da fluorescência. Este é um ponto definido pelo pesquisador e constar na fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formado aumenta de forma satisfatória quando comparados a concentração inicial de fitas molde que traduz a fluorescência da base (*background)*. O ciclo

exato no qual o limiar de fluorescência é definido denomina-se ciclo limiar (Ct: *threshold cycle*). Amostras mais concentradas, ou seja, com maior número de fitas molde iniciais atingem o limiar mais precocemente e exibem valores de Ct mais baixos.

Quando a eficiência da reação de RT-PCR está próxima de 100%, o número de cópias geradas aumenta de forma exponencial, dobrando a cada ciclo da reação (Figura 6).

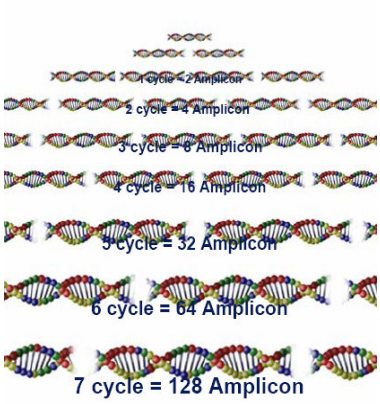


Figura 6. O número de cópias geradas aumenta de forma exponencial, dobrando a cada ciclo da reação

O número de fitas-molde presentes no início da reação pode ser calculado a partir do Ct. Assim, a equação $Nf = No\ (1+E)^n$ descreve a amplificação exponencial de RT-PCR, onde Nf é o número de fita-molde em um determinado ciclo da reação, No é o número de fita molde inicial, E é a eficiência de amplificação da reação e N corresponde ao número de ciclos.

A análise da expressão gênica por meio de PCR quantitativo usado em nosso estudo representa uma quantificação relativa dos genes de interesse, uma vez que requer um controle endógeno, ou seja, um gene cuja expressão não apresente variação estatisticamente significativa entre

as amostras analisadas. Mas estudos recentes demonstram que a expressão de genes, mesmo considerados referência, pode variar de acordo com situações como hipóxia, tratamentos experimentais, podendo alterar e modificar a expressão desses genes, interferindo no resultado dos experimentos (Janseens *et al.*, 2004), sugerindo que não existe um gene de referência ideal.

3.2.9 Genes de referências

Dentre os genes de referência previamente utilizados por Paik *et al.* (2004) e também em nosso grupo por Benvenuti (2008), três dos seis genes testados se mantiveram mais estáveis RPLP0, PPIA e GUSB.

RPLP0 (*Ribosomal phosphoprotein, large, P0*) codifica uma proteína ribossomal que é um componente da subunidade 60S. Esta é uma fosfoproteína neutra (P0) com uma região C-terminal quase idêntica à porção C-terminal das fosfoproteínas ácidas ribossomais P1 e P2 e localiza-se no citoplasma (Rich e Steitz, 1987). Foi também utilizado, como gene de referência para normalizar a expressão dos genes de interesse em RT-PCR em Tempo Real em um estudo com 79 amostras de tumor de mama e o mesmo foi escolhido por apresentar melhor controle de qualidade (De Cremoux *et al.*, 2004). Em outro estudo, foram testados 16 genes constitutivos, avaliados de duas regiões cerebrais, região pré-frontal e córtex-motor e RPLP0, foi o gene, entre tantos candidatos que se apresentou como um dos mais estáveis na região pré-frontal (Johansson *et al.*; 2007).

PPIA (*Peptidyl-prolyl isomerase A*) codifica um membro da família da peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase), enzimas que catalisam a cis-trans isomerização da prolina e aceleram a dobradura das proteínas. Em um estudo para validação de genes endógenos por RT-PCR em Tempo Real para câncer de mama, foram testados 11 candidatos, na qual o PPIA e MRPL19 foram os genes escolhidos como mais estáveis (McNeil *et al.*, 2007).

GUSB (*beta glucuronidase)* codifica a beta glicuronidase, uma hidrolase lisossomal envolvida na degradação do ácido glicurônico contendo glicosaminoglicanos (Shipley *et al.*, 1993). Hucz *et al.* (2006) indicam o GUSB como gene de referência para avaliar a expressão gênica em amostras de tireóide.

3.3 Condições da reação de RT-PCR em Tempo Real

Para padronizar a melhor temperatura a ser utilizada em RT-PCR em Tempo Real dos genes estudados, utilizamos o RT-PCR convencional, linhagens celulares mamárias tumorais (MDA-MB-231 e MCF-7) e células MDA-MB-231 e HB4A como célula referência, respectivamente. A padronização para todos os *primers* foi: temperatura inicial de 95°C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de três temperaturas, sendo a primeira 95°C por 30 segundos para desnaturação das fitas, 60°C por 30 segundos para o anelamento dos *primers* e por último 72°C por mais 40 segundos para extensão. Com exceção do *primer* LCN2, onde a temperatura de anelamento foi de 62°C por 30 segundos (Figura7).

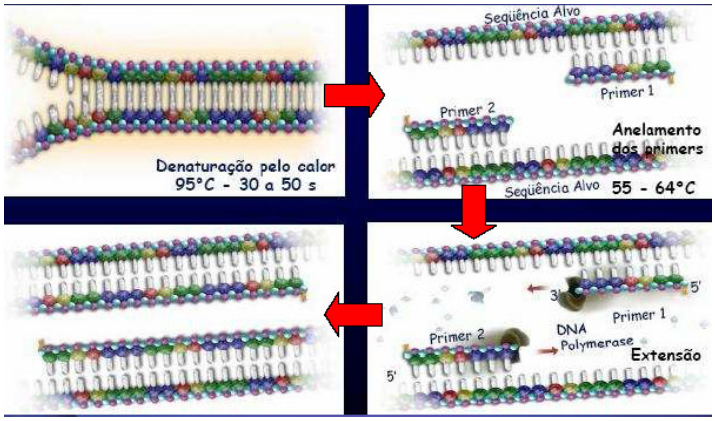


Figura 7. Temperatura inicial para desnaturação da fita de cDNA, seguida de uma temperatura menor para anelamento dos *primers* e aumento da temperatura para iniciar a extensão da molécula

Para cada reação de RT-PCR em Tempo Real foi utilizado a 200ng de cDNA, 1x tampão de PCR 10X , 2 mM de $MgCl_2$ (50mM), 0,2 mM de dNTP (2.5mM), 0,2 mM de cada oligonucleotídeo (direto e reverso) (10µM), 0,75µL de DMSO, 0,3µL de DNA *polimerase Taq Platinum* (5U/µL) (Invitrogen, USA), 0.15µL de *Sybr Green I* (1/100) e completado com água ultra pura para o total de 15µL. Foi utilizado o termociclador *Gene Amp* (Perkin Elmer, EUA) e o sistema operacional Rotor Gene™ 6 System (Corbett Research, Mortlake, Sydney, Austrália).

As reações foram realizadas em duplicatas e os valores dos Cts dos ensaios foram considerados satisfatórios se não apresentassem diferença maior que 1.

Curva de quantificação

A curva de quantificação da expressão gênica se dá a partir do Ct, parâmetro definido como o numero de ciclos em que a fluorescência gerada pelo *Syber Green I* atinge um limite acima da fluorescência de fundo.

Especificidade do amplicon

Curva de desnaturação ou *melting curve* permite a confirmação da especificidade da amplificação, onde são relacionadas à fluorescência e a temperatura; esta curva consiste na monitoração da fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura de fusão ou *melting temperature* (Tm) de cada fragmento resultante da reação de amplificação. Cada linha representa uma amostra, as quais estão em duplicata. (Tabela 3 e Figura 8).

Tabela 3. Temperatura de fusão ou *Melting Temperature* de todos os genes referência (RPLP0, PPIA e GUSB) e de interesse (HNMT, IL6, PAK1, PRSS11, FN3K, COMT, SOD2 e LCN2)

Genes	T° de Fusão
RPLP0	85.5°C
PPIA	83°C
GUSB	85°C
HNMT	86°C
IL6	83°C
PAK1	83°C
PRSS11	86°C
FN3K	89°C
COMT	86.5°C
SOD2	82°C
LCN2	88°C

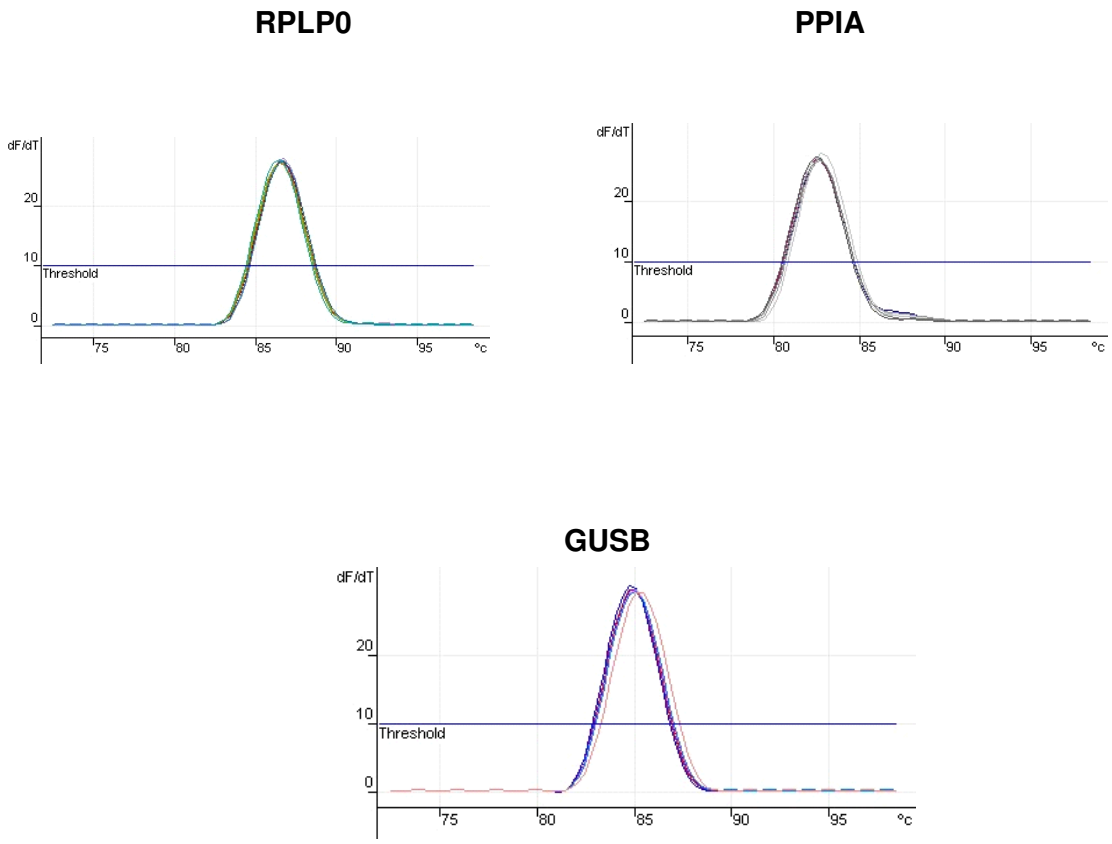


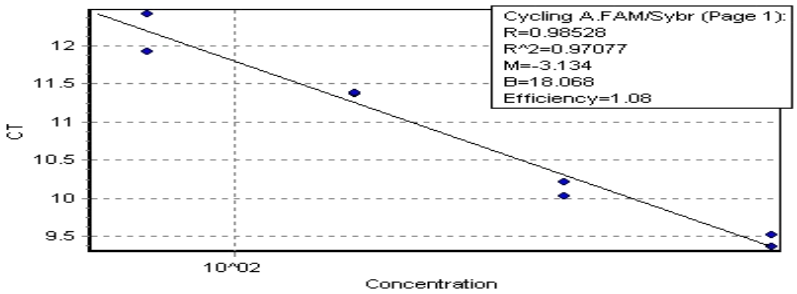
Figura 8. Curva de desnaturação dos genes referência (RPLP0, PPIA e GUSB) apresentando um único pico, mostrando a especificidade da reação

Eficiência da Reação

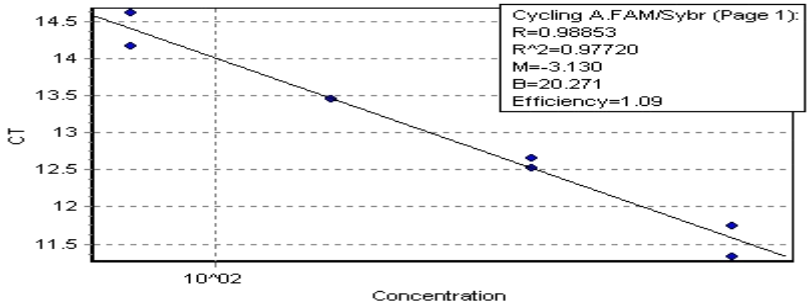
Determinamos à eficiência de cada oligonucleotídeo iniciador por RT-PCR em Tempo Real, como sugerido por Pfaffl *et al.* (2001). Utilizamos um *pool* de cDNA de células MDA-MB231 diluídos em concentrações de 500ng, 250ng, 125ng, 62,5ng. O ensaio foi feito em duplicata para todos os genes analisados. Todos os oligonucleotídeos iniciadores utilizados apresentaram eficiências de reação próximas de 1 (0,9-1,1), ou seja, a cada ciclo de

amplificação houve duplicação de aproximadamente 100% dos transcritos alvos (Figuras 9).

Curva padrão da eficiência para o gene RPLPO



Curva padrão da eficiência para o gene PPIA



Curva padrão da eficiência para o gene GUSB

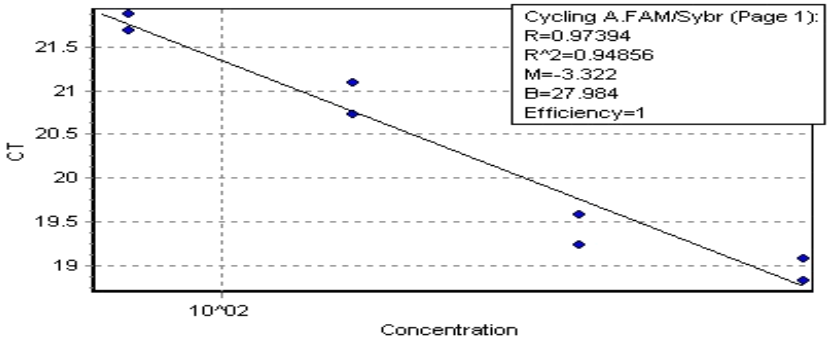


Figura 9. Curva de eficiência dos genes endógenos RPLP0, PPIA e GUSB. As duplicatas apresentam-se plotadas neste gráfico que traça uma reta através de regressão linear, quanto mais próximo da reta estiverem, mais eficiente é a reação

Fator de Normalização de RT-PCR

Determinamos inicialmente quais genes seriam utilizados para obter o fator de normalização (média geométrica dos valores de expressão relativa dos genes referência) (Vandesompele *et al.*, 2002). A *estabilidade da expressão dos genes RPLP0, PPIA e GUSB foi avaliada pelo programa geNorm (Microsoft Excel), (http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/)* muito utilizado para escolha dos genes referência em diversos estudos para diferentes amostras (Johansson *et al.*, 2007, McNeil *et al.*, 2007, Ling *et al.*, 2008).

O programa *geNorm* avalia a razão de expressão de cada gene referência em relação aos demais sempre aos pares permitindo o cálculo do desvio padrão desses valores transformando em escala logarítima, então, a média do desvio padrão de cada gene em relação aos demais é calculado fornecendo uma medida de estabilidade de expressão desse gene (M). O gene com a expressão mais estável tem o valor de M mais baixo, permitindo então a exclusão dos genes menos estáveis (Vandesompele *et al.*, 2002). Os genes referência que encaixavam nesse perfil foram RPLP0 e PPIA (Figura 10) (Tabela 4 e 5).

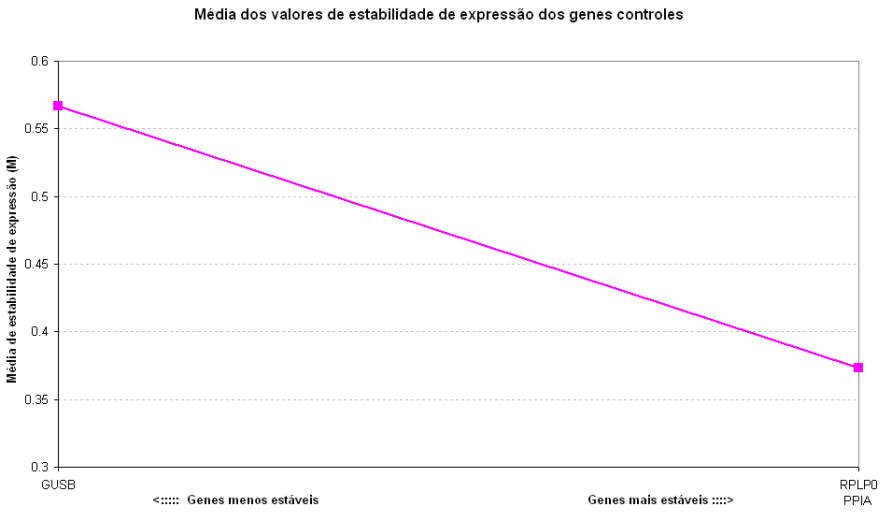


Figura 10. Média de estabilidade dos genes referência, onde RPLP0 e PPIA são considerados os genes mais estáveis. Medida de estabilidade de expressão (M)

Tabela 4. Medida de estabilidade da expressão (M) dos genes de referência em amostras de células MDA-MB231 cultivadas isoladamente (a, b e c); células MDA-MB231 co-cultivadas com fibroblastos de linfonodos não comprometidos (1, 2, 3, 4 e 5) e comprometidos (6,7,8,9 e 10). MDA-MB231 (utilizada como célula referência)

Change Data	RPLP0	PPIA	GUSB	Normalisation Factor
MDA (a)	7.68E-01	1.46E+00	1.25E+00	0.6333
MDA (b)	4.86E-01	1.02E+00	9.53E-01	0.4411
MDA (c)	5.43E-01	1.77E+00	1.34E+00	0.6152
MDA.FN(-) 1	7.76E-01	2.30E+00	9.63E-01	0.6772
MDA.FN(-) 2	1.89E+00	4.61E+00	2.45E+00	1.5683
MDA.FN(-) 3	1.24E+00	5.17E+00	2.51E+00	1.4266
MDA.FN(-) 4	9.97E-01	2.40E+00	1.65E+00	0.8935
MDA.FN(-) 5	9.59E-01	2.06E+00	1.00E+00	0.7100
MDA.FN(+) 6	1.41E+00	3.73E+00	1.06E+00	1.0053
MDA.FN(+) 7	1.18E+00	4.35E+00	1.05E+00	0.9914
MDA.FN(+) 8	1.75E+00	7.54E+00	2.86E+00	1.8977
MDA.FN(+) 9	2.52E+00	6.94E+00	1.40E+00	1.6425
MDA.FN(+) 10	2.65E+00	6.68E+00	2.31E+00	1.9488
M < 1.5	0.503	0.534	0.664	

Tabela 5. Medida de estabilidade da expressão (M) dos genes de referência em amostras de células MCF-7 cultivadas isoladamente (a, b e c); células MCF-7 co-cultivadas com fibroblastos de linfonodos não comprometidos (1,2 e 3) e comprometidos (4, 5 e 6). HB4A (utilizada como célula referência)

Change Data	RPLP0	PPIA	GUSB	Normalisation Factor
MCF-7 (a)	4.68E-01	3.07E-01	1.79E-01	2.0103
MCF-7 (b)	7.12E-01	3.99E-01	1.89E-01	2.5682
MCF-7 (c)	7.60E-01	2.19E-01	1.01E-01	1.7440
MCF7.FN (-) 1	3.94E-01	1.56E-01	1.36E-02	0.6406
MCF7.FN (-) 2	5.27E-01	2.63E-01	1.20E-02	0.8080
MCF7.FN(-) 3	4.29E-01	1.70E-01	1.60E-02	0.7165
MCF7.FN(+) 4	6.90E-01	3.06E-02	7.92E-03	0.3752
MCF7.FN(+) 5	3.78E-01	1.20E-01	4.09E-02	0.8365
MCF7.FN(+) 6	3.96E-01	1.42E-01	4.89E-02	0.9542
M < 1.5	1.418	1.225	1.497	

Avaliação da expressão dos genes alvos

A expressão diferencial dos genes de interesse foi determinada pelo método de quantificação relativa em relação ao fator de normalização. A quantificação da expressão gênica de células MDA-MB231 co-cultivadas com fibroblastos de linfonodos comprometidos e não comprometidos em relação com as mesmas células cultivadas isoladamente.

Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizado o modelo matemático proposto por Pfaffl *et al.* (2001).

$$\frac{R = (E\ alvo)^{\Delta CT\ alvo\ (referência\ -\ amostra)}}{R = (E\ ref)^{\Delta CT\ ref\ (referência\ -\ amostra)}}$$

Onde: **E** corresponde a eficiência da reação de amplificação. Para todos os *primer*s utilizados consideramos a eficiência igual a 100%, ou seja, a cada ciclo ocorre uma duplicação do transcrito molde. Neste caso, o E é igual a dois. O **Δct amostra**

corresponde a média dos CTs do gene alvo na amostra alvo e **Δct ref** corresponde a média do gene alvo na amostra referência .

Neste trabalho o cálculo da expressão diferencial foi realizado substituindo o denominador [**E**constitutivo(Δct ref)-(Δct amostra)] pelo fator de normalização (FN), como sugerido por Vandesompele *et al.* (2002), ficando então:

$$\mathbf{R} = \mathbf{E}_{alvo}^{(\Delta ct\ ref)-(\Delta ct\ amostra)} / \mathbf{FN}$$

Análise estatística dos resultados

Utilizamos o teste *Kruskal Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Mann Withney*, o nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$. Determinamos a correlação dos dados entre *cDNA microarray* e da RT-PCR em Tempo Real pelo teste *Spearman*.

4. RESULTADOS

4.1 Expressão gênica diferencial de células MDA-MB231 na presença de fibroblastos de linfonodo de pacientes com câncer de mama determinada por ensaio de cDNA *microarray*

Para avaliar o perfil de expressão gênica células MDA-MB231 na presença de fibroblastos de linfonodo não comprometido e comprometido realizamos ensaios de co-cultura e *cDNA microarray.* Os genes diferencialmente expressos foram aqueles onde p≤0,01 (teste t de *Student)*, FDR (*False Discovery Ratio*) ≤ 0,01 e variação de expressão entre os grupos analisados ≥ 2.

Cento e cinqüenta e cinco genes (155) foram modulados em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo não comprometido, em relação às células MDA-MB231 cultivadas isoladamente, sendo que setenta e oito (78) genes foram modulados exclusivamente nessa condição (Tabela 6) (Figura 11).

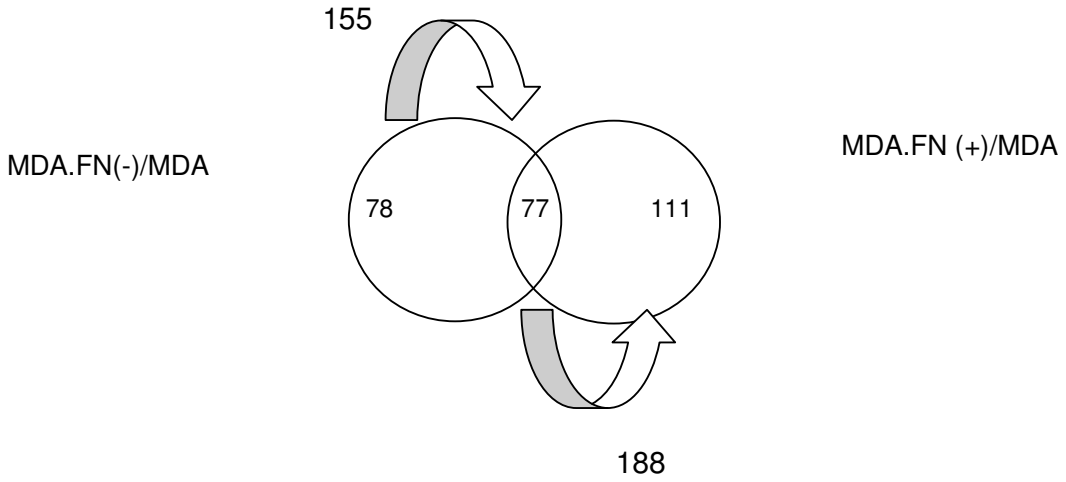


Figura 11. Diagrama de Venn: Número de genes diferencialmente expressos em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodos não comprometidos (MDA.FN(-)/MDA) (n=155 genes) e de genes diferencialmente expressos em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo comprometido (MDA.FN(+)/MDA) (n=188 genes). Setenta e sete genes foram diferencialmente expressos em células MDA-MB231 co-cultivadas na presença de fibroblastos

Tabela 6. Genes diferencialmente expressos em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo não comprometido [MDA.FN(-)] em comparação as células cultivadas isoladamente. Setenta e oito genes foram diferencialmente expressos exclusivamente em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo não comprometido (mas não em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo comprometido).Três ensaios de monocultura de células MDA-MB231 e co-cultura (fibroblastos obtidos de linfonodos não comprometidos de 3 pacientes) independentes foram realizados. Genes diferencialmente expressos foram aqueles em que p ≤0.01 (teste t de *Student*), FDR ≤0.01 e variação de expressão entre grupos ≥2); m: log2 média da expressão gênica de células MDA-MB231/HB4A; Fc:variação de expressão entre os grupos

GENE	MDA.FN(-) (m)	MDA (m)	Fc
FN3K *(fructosamine-3-kinase)*	-3,82	-0,59	-9,42
GPSN2 *(glycoprotein, synaptic 2)*	-0,99	1,01	-4,00
GSN (*gelsolin (amyloidosis, Finnish type))*	0,15	2,05	-3,73
DGAT2 (*diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse))*	-0,95	0,89	-3,57
S100P *(S100 calcium binding protein P)*	-4,41	-2,68	-3,32
LOC149420 *(casein kinase)*	-0,71	0,86	-2,98
HEG *(HEG homolog)*	-0,61	0,87	-2,78
TAF12 *(TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa)*	-1,40	0,04	-2,71
COX5B *(cytochrome c oxidase subunit Vb)*	-1,19	0,22	-2,66
PSMD8 *(proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8)*	0,02	1,39	-2,59
SSBP2 *(single-stranded DNA binding protein 2)*	-1,23	0,10	-2,51
SOD2 *(superoxide dismutase 2, mitochondrial)*	-0,48	0,84	-2,51
PAK1 *(p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (STE20 homolog, yeast))*	-0,56	0,74	-2,47
MVP *(major vault protein)*	0,74	2,03	-2,44
KIAA1043 *(KIAA1043 protein)*	-1,37	-0,09	-2,42
FAM32A *(family with sequence similarity 32, member A)*	0,43	1,69	-2,39
UBE2L6 *(ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6)*	0,02	1,28	-2,39
DIBD1 *(disrupted in bipolar affective disorder 1)*	-0,51	0,74	-2,38
MYST1 *(MYST histone acetyltransferase 1)*	-0,63	0,60	-2,35
C6orf4 *(chromosome 6 open reading frame 4)*	-1,65	-0,50	-2,23
CITED2 *(Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2)*	0,49	1,64	-2,22
WFS1 *(Wolfram syndrome 1 (wolframin))*	-1,21	-0,07	-2,21
FAP *(fibroblast activation protein, alpha)*	-1,51	-0,38	-2,20
NSE1 *(non-SMC (structural maintenance of chromosomes) element 1 protein)*	-1,32	-0,20	-2,18
PSMD*7 (proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7 (Mov34 homolog))*	0,48	1,58	-2,14
LITAF *(lipopolysaccharide-induced TNF factor)*	-0,97	0,11	-2,11
PSMB9 *(proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional protease 2))*	-0,31	0,75	-2,09
ETHE*1 (ethylmalonic encephalopathy 1)*	-0,28	0,78	-2,08
ADD3 *(adducin 3 (gamma))*	-1,02	0,02	-2,06
FLJ10597 *(hypothetical protein FLJ10597)*	-0,42	0,62	-2,05
CBLB *(Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b)*	-0,58	0,46	-2,05
PGD *(phosphogluconate dehydrogenase)*	-0,77	0,27	-2,04
RFXANK *(regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein)*	-0,35	0,67	-2,04
AKAP8L *(A kinase (PRKA) anchor protein 8-like)*	-0,39	0,64	-2,03
STOML2 *(stomatin (EPB72)-like 2)*	0,08	1,09	-2,01

GENE	MDA.FN(-) (m)	MDA (m)	Fc
GCH1 *(GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia))*	-1,39	-2,39	2,00
KIAA0217 *(KIAA0217)*	0,97	-0,03	2,00
CTCF *(CCCTC-binding factor (zinc finger protein))*	0,24	-0,77	2,02
DDX21 *(DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21)*	0,89	-0,15	2,06
C20orf6 *(chromosome 20 open reading frame 6)*	1,00	-0,06	2,08
LMAN2L *(lectin, mannose-binding 2-like)*	0,72	-0,34	2,09
PRKRIR *(protein-kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent inhibitor, repressor of (P58 repressor))*	-1,44	-2,53	2,13
USP1 *(ubiquitin specific protease 1)*	0,24	-0,86	2,15
IL4R *(interleukin 4 receptor)*	1,95	0,84	2,16
SOAT1 *(sterol O-acyltransferase (acyl-Coenzyme A: cholesterol acyltransferase) 1)*	1,32	0,20	2,17
SH3BP4 *(SH3-domain binding protein 4)*	0,76	-0,36	2,17
LOC129642 *(hypothetical protein BC016005)*	0,33	-0,81	2,20
TFDP1 *(transcription factor Dp-1)*	-0,66	-1,80	2,21
PTPN11 *(protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 (Noonan syndrome 1))*	0,62	-0,55	2,25
CUL3 *(cullin 3)*	0,49	-0,68	2,25
PPP3CA *(protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform (calcineurin A alpha))*	0,95	-0,22	2,25
RBPSUH *(recombining binding protein suppressor of hairless (Drosophila))*	-0,04	-1,23	2,29
LOC51136 *(PTD016 protein)*	0,06	-1,15	2,31
E2F3 *(E2F transcription factor 3)*	0,91	-0,29	2,31
SRPRB *(signal recognition particle receptor, B subunit)*	-0,29	-1,50	2,32
EHHADH (enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase)	0,89	-0,33	2,33
FOXP1 *(forkhead box P1)*	2,86	1,60	2,39
SORT1 (sortilin 1)	1,21	-0,05	2,40
BCL7B *(B-cell CLL/lymphoma 7B)*	1,16	-0,12	2,43
PSME4 *(proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4)*	0,92	-0,38	2,46
ABCE1 *(ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1)*	0,47	-0,86	2,52
PHTF1 *(putative homeodomain transcription factor 1)*	-0,19	-1,54	2,55
PIAS3 *(protein inhibitor of activated STAT3)*	0,21	-1,17	2,59
TM4SF10 *(transmembrane 4 superfamily member 10)*	1,34	-0,10	2,71
TGFB2 *(transforming growth factor, beta 2)*	2,24	0,78	2,75
RC1-IT0013-022-C08 *(CDNA FLJ31353 fis, clone MESAN2000264)*	0,31	-1,15	2,75
QV3-DT0045-063-F01 *(CDNA FLJ13267 fis, clone OVARC1000964)*	2,31	0,84	2,78
FLJ32421 *(hypothetical protein FLJ32421)*	-0,54	-2,04	2,83
KHDRBS3 *(KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3)*	0,42	-1,08	2,83
SLC7A5 *(solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5)*	0,32	-1,22	2,91
CYP1B1 *(cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1)*	0,90	-0,66	2,95
HYPK *(Huntingtin interacting protein K)*	0,89	-0,68	2,95
ARS2 *(arsenate resistance protein ARS2)*	1,32	-0,29	3,04
MRPL47 *(mitochondrial ribosomal protein L47)*	0,53	-1,08	3,06
TOMM20 *(translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast))*	1,31	-0,31	3,06
ZNF189 *(zinc finger protein 189)*	-0,04	-1,72	3,21
H41 *(hypothetical protein H41)*	0,01	-1,79	3,48
OSR2 *(odd-skipped-related 2A protein)*	0,88	-0,93	3,50

Cento e oitenta e oito genes (188) genes foram modulados em células MDA-MB231 co-cultivadas na presença de fibroblastos de linfonodo comprometido, dos quais cento e onze (111) genes foram modulados exclusivamente nesta condição. (Tabela 7) (Figura 11).

Tabela 7. Genes diferencialmente expressos em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo comprometido [MDA.FN(+)] em comparação as células cultivadas isoladamente. Cento e onze genes foram diferencialmente expressos exclusivamente em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo comprometido (mas não em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo não comprometido).Três ensaios de monocultura de células MDA-MB231 e co-cultura (fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos de 3 pacientes) independentes foram realizados. Genes diferencialmente expressos foram aqueles em que p ≤0.01 (teste t de *Student*), FDR ≤0.01 e variação de expressão entre grupos ≥2); m: log2 média da expressão gênica de células MDA-MB231/HB4A; Fc:variação de expressão entre os grupos

GENE	MDA.FN(+) (m)	MDA (m)	Fc
SYNGR3 *(synaptogyrin 3)*	-0,86	1,59	-5,48
ZNF19 *(zinc finger protein 19 (KOX 12))*	-1,17	1,23	-5,28
PBXIP1 *(pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1)*	-1,20	1,15	-5,10
GALC *(galactosylceramidase (Krabbe disease))*	-1,20	0,99	-4,56
DPP4 *(dipeptidylpeptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2))*	-0,49	1,61	-4,30
SPINT*2 (serine protease inhibitor, Kunitz type, 2)*	-1,71	0,23	-3,85
IRF*7 (interferon regulatory factor 7)*	1,05	2,71	-3,16
PTPRH *(protein tyrosine phosphatase, receptor type, H)*	-1,36	0,29	-3,13
AHSA1 *(AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast))*	-0,34	1,27	-3,04
LZTS2 *(leucine zipper, putative tumor suppressor 2)*	-0,28	1,29	-2,96
TRPC4AP *(transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 associated protein)*	0,02	1,58	-2,94
ODC-p (ornithine decarboxylase-like)	-0,56	1,00	-2,94
PP2135 *(PP2135 protein)*	-1,52	0,02	-2,92
TOM1L2 *(target of myb1-like 2 (chicken))*	-1,23	0,28	-2,85
PFDN2 *(prefoldin 2)*	-0,43	1,06	-2,80
PTK2B *(PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta)*	-0,01	1,48	-2,80
ADFP *(adipose differentiation-related protein)*	1,71	3,19	-2,79
C10orf10 *(chromosome 10 open reading frame 10)*	-0,02	1,46	-2,79
ATP5G2 *(ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 2)*	-0,84	0,64	-2,77
LY6G5B *(lymphocyte antigen 6 complex, locus G5B)*	-1,81	-0,36	-2,73
CTL2 *(CTL2 gene)*	-2,03	-0,58	-2,73
CPD *(carboxypeptidase D)*	0,33	1,68	-2,55
PROS*1 (protein S (alpha))*	-3,04	-1,70	-2,53
TM7SF3 *(transmembrane 7 superfamily member 3)*	-1,34	-0,02	-2,50
TMEM*8 (transmembrane protein 8 (five membrane-spanning domains))*	-0,55	0,75	-2,46
CDKN2D *(cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4))*	0,86	2,16	-2,46

GENE	MDA.FN(+) (m)	MDA (m)	Fc
INADL *(InaD-like protein)*	-1,70	-0,42	-2,42
NSE2 *(breast cancer membrane protein 101)*	-3,20	-1,94	-2,39
DAG1 *(dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1))*	-1,48	-0,24	-2,36
KIAA0676 *(KIAA0676 protein)*	-0,99	0,23	-2,32
DKFZP434K046 *(hypothetical protein DKFZp434K046)*	-2,20	-0,99	-2,32
KIAA1522 *(KIAA1522 protein)*	-0,83	0,38	-2,31
TESK*1 (testis-specific kinase 1)*	0,01	1,21	-2,30
LOC56965 *(hypothetical protein from EUROIMAGE 1977056)*	-1,33	-0,14	-2,29
PRSS11 *(protease, serine, 11 (IGF binding))*	3,04	4,23	-2,28
FLJ10055 *(hypothetical protein FLJ10055)*	0,84	2,02	-2,26
HLA-F *(major histocompatibility complex, class I, F)*	1,50	2,67	-2,25
RPS6KA1 *(ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1)*	-0,08	1,08	-2,24
ITGB5 *(integrin, beta 5)*	-1,62	-0,47	-2,21
FTHFSDC1 *(formyltetrahydrofolate synthetase domain containing 1)*	-2,14	-1,01	-2,19
KATNB1 *(katanin p80 (WD repeat containing) subunit B 1)*	-0,09	1,01	-2,14
LPIN2 *(lipin 2)*	-0,36	0,70	-2,08
CTSH *(cathepsin H)*	-1,88	-0,84	-2,06
FBXW1B *(F-box and WD-40 domain protein 1B)*	-1,04	0,00	-2,06
CCM2 (*cerebral cavernous malformation 2)*	0,52	1,55	-2,04
PRKCZ *(protein kinase C, zeta)*	-0,93	0,09	-2,03
SORBS1 *(sorbin and SH3 domain containing 1)*	-0,55	0,46	-2,02
FLJ13710 *(hypothetical protein FLJ13710)*	-0,32	0,69	-2,02
SPPL3 *(signal peptide peptidase 3)*	-1,30	-0,29	-2,02
USP20 *(ubiquitin specific protease 20)*	-0,07	0,94	-2,01
PLA2G5 *(phospholipase A2, group V)*	-1,80	-0,79	-2,01
TARDBP *(TAR DNA binding protein)*	0,95	-0,06	2,01
C1GALT2 *(core 1 UDP-galactose:N-acetylgalactosamine-alpha-R beta 1,3-galactosyltransferase 2)*	0,58	-0,44	2,03
PIR5*1 (RAD51-interacting protein)*	-0,90	-1,92	2,03
GABRB3 *(gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 3)*	1,14	0,11	2,04
RAB8A *(RAB8A, member RAS oncogene family)*	1,19	0,15	2,05
TIE *(tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains)*	1,15	0,10	2,07
TACR*2 (tachykinin receptor 2)*	0,23	-0,84	2,10
ODC1 *(ornithine decarboxylase 1)*	1,67	0,60	2,10
C7orf36 *(chromosome 7 open reading frame 36)*	0,02	-1,06	2,12
CIRH1A *(cirrhosis, autosomal recessive 1A (cirhin))*	0,63	-0,46	2,14
LOC54499 *(putative membrane protein)*	0,14	-0,96	2,15
SLC16A14 *(solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 14)*	0,13	-1,00	2,18
PP784 *(PP784 protein)*	-0,77	-1,92	2,22
KIDINS220 (likely homolog of rat kinase D-interacting substance of 220 kDa)	0,37	-0,78	2,22
CPNE1 *(copine I)*	0,66	-0,49	2,22
C3orf4 *(chromosome 3 open reading frame 4)*	1,61	0,46	2,22
SFRS6 *(splicing factor, arginine/serine-rich 6)*	0,47	-0,69	2,23
SPEC2 *(non-kinase Cdc42 effector protein SPEC2)*	-1,25	-2,41	2,23
TSGA14 *(testis specific, 14)*	0,96	-0,21	2,26
TPX2 *(TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis))*	0,80	-0,41	2,31
KEL *(Kell blood group)*	1,18	-0,03	2,32
TEKT3 *(tektin 3)*	0,39	-0,84	2,33
PAK6 *(p21(CDKN1A)-activated kinase 6)*	0,61	-0,62	2,36
TORC3 *(transducer of regulated cAMP response element-binding protein (CREB) 3)*	0,40	-0,85	2,38

GENE	MDA.FN(+) (m)	MDA (m)	Fc
CSTF3 *(cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 3, 77kDa)*	1,14	-0,14	2,44
AMD1 *(adenosylmethionine decarboxylase 1)*	0,76	-0,55	2,46
FLJ22794 *(FLJ22794 protein)*	0,59	-0,74	2,51
HNRPH3 *(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9))*	0,61	-0,72	2,53
KIAA0020 *(KIAA0020)*	1,20	-0,14	2,53
UBE1C *(ubiquitin-activating enzyme E1C (UBA3 homolog, yeast))*	0,84	-0,52	2,56
TLOC1 *(translocation protein 1)*	1,21	-0,15	2,57
VPS26 *(vacuolar protein sorting 26 (yeast))*	1,22	-0,16	2,61
CCT5 *(chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon))*	1,25	-0,14	2,62
SFRS2 *(splicing factor, arginine/serine-rich 2)*	0,02	-1,37	2,62
MDS025 *(hypothetical protein MDS025)*	0,56	-0,84	2,64
KNSL7 *(kinesin-like 7)*	1,29	-0,12	2,65
KIAA0483 *(KIAA0483 protein)*	0,83	-0,58	2,66
AKAP11 *(A kinase (PRKA) anchor protein 11)*	-0,04	-1,49	2,74
NMI *(N-myc (and STAT) interactor)*	-0,67	-2,12	2,74
KIAA1279 *(KIAA1279)*	1,10	-0,37	2,76
MGC17943 *(hypothetical protein MGC17943)*	0,40	-1,07	2,77
THBS1 *(thrombospondin 1)*	1,37	-0,11	2,78
NUCB2 *(nucleobindin 2)*	1,29	-0,21	2,84
IRA1 *(likely ortholog of mouse IRA1 protein)*	0,47	-1,04	2,85
COPS5 *(COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5 (Arabidopsis))*	0,91	-0,61	2,87
CSNK1D *(casein kinase 1, delta)*	0,97	-0,56	2,89
CML66 *(chronic myelogenous leukemia tumor antigen 66)*	1,30	-0,24	2,90
GDI2 *(GDP dissociation inhibitor 2)*	1,71	0,10	3,06
SOX17 *(SRY (sex determining region Y)-box 17)*	0,46	-1,16	3,08
FBXL14 *(F-box and leucine-rich repeat protein 14)*	2,19	0,56	3,10
DDX52 *(DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 52)*	1,63	-0,14	3,40
FLJ11106 *(hypothetical protein FLJ11106)*	1,32	-0,46	3,44
SPEC1 *(small protein effector 1 of Cdc42)*	1,70	-0,10	3,48
NEDD4L *(neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like)*	1,50	-0,30	3,49
AREG *(amphiregulin (schwannoma-derived growth factor))*	3,94	2,04	3,73
PSMA5 *(proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5)*	0,82	-1,15	3,93
FRAS1 *(Fraser syndrome 1)*	2,09	0,10	3,97
HECTD1 *(HECT domain containing 1)*	1,48	-0,69	4,49
STK3 *(serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast))*	1,63	-0,69	5,00
SERPINB2 *(serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2)*	2,77	0,19	5,96

Setenta e sete (77) genes foram modulados em ambas as condições, isto é, em células MDA-MB231 co-cultivadas tanto com fibroblastos de linfonodos não comprometidos como de linfonodos comprometidos (Tabela 8).

Tabela 8. Genes diferencialmente expressos entre células MDA-MB231 co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo não comprometido [MDA.FN(-)] ou comprometido [MDA.FN(+)] em comparação às células MDA-MB231 cultivadas isoladamente. Setenta e sete genes foram comumente modulados em células MDA-MB231 na presença de fibroblastos. Três ensaios de monocultura de células MDA-MB231 e co-cultura (fibroblastos obtidos de linfonodos não comprometidos e comprometidos de 3 pacientes) independentes foram realizados. Genes diferencialmente expressos foram aqueles em que p ≤0.01 (teste t de *Student*), FDR ≤0.01 e variação de expressão entre grupos ≥2); m: log2 média da expressão gênica de células MDA-MB231/HB4A; Fc:variação de expressão entre os grupos

Gene	MDA (m)	MDA. FN(-) (m)	MDA. FN(+) (m)	MDA. FN(-) (Fc)	MDA. FN(+) (Fc)
HNMT *(histamine N-methyltransferase)*	1,98	-0,72	-1,78	-6,49	-13,55
LCN2 *(lipocalin 2 (oncogene 24p3)*	1,72	-1,32	-1,27	-8,22	-7,94
SLC22A18 *(solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 18)*	0,4	-2,55	-2,33	-7,72	-6,63
PIM1 *(pim-1 oncogene)*	0,9	-0,43	-1,48	-2,51	-5,22
TKT *(transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome))*	1,58	-0,09	-0,65	-3,18	-4,7
SMARCD3 *(SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3)*	0,24	-1,08	-1,88	-2,49	-4,34
C6orf62 *(chromosome 6 open reading frame 62)*	0,53	-0,6	-1,47	-2,2	-4,01
SNN (*stannin)*	-0,2	-1,91	-2,16	-3,27	-3,89
TEF *(thyrotrophic embryonic factor)*	-0,14	-1,32	-2,05	-2,26	-3,76
D2S448 *(Melanoma associated gene)*	1,28	-0,33	-0,62	-3,05	-3,73
VCP *(valosin-containing protein)*	-0,21	-1,58	-2,05	-2,58	-3,57
MGC3169 *(hypothetical protein MGC3169)*	1,65	0,05	-0,11	-3,04	-3,38
RHOC *(ras homolog gene family, member C)*	0,31	-1,06	-1,43	-2,59	-3,35
FLJ1052*1 (hypothetical protein FLJ10521)*	0,71	-0,83	-0,89	-2,91	-3,04
RABAC1 (*Rab acceptor 1 (prenylated))*	1,36	-0,34	-0,25	-3,24	-3,04
CENTG3 *(centaurin, gamma 3)*	2,7	1,31	1,1	-2,62	-3,03
NPEPL1*(aminopeptidase-like 1)*	-0,5	-1,85	-2,09	-2,54	-3
KIAA0218 *(KIAA0218 gene product)*	-0,37	-2,06	-1,9	-3,23	-2,89
GPR56 *(G protein-coupled receptor 56)*	-1,89	-3,35	-3,41	-2,75	-2,87
P4HB *(procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase; thyroid hormone binding protein p55)*	0,67	-0,51	-0,83	-2,28	-2,83
RNF141 *(ring finger protein 141)*	3,63	1,77	2,13	-3,63	-2,83
CDW92 *(CDW92 antigen)*	-1,27	-2,28	-2,76	-2,01	-2,81
DBN1 *(drebrin 1)*	0,88	-0,34	-0,6	-2,33	-2,8
PIK3C3 *(phosphoinositide-3-kinase, class 3)*	3,11	1,21	1,63	-3,73	-2,79
KDELR3 *(KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3)*	1,38	-0,37	0	-3,37	-2,61

Gene	MDA (m)	MDA. FN(-) (m)	MDA. FN(+) (m)	MDA. FN(-) (Fc)	MDA. FN(+) (Fc)
PARD6A *(par-6 partitioning defective 6 homolog alpha (C.elegans))*	-0,56	-1,84	-1,92	-2,44	-2,58
SCAM-1 *(vinexin beta (SH3-containing adaptor molecule-1))*	2,09	0,62	0,72	-2,76	-2,58
SUFU *(suppressor of fused homolog (Drosophila))*	0,92	-0,28	-0,43	-2,29	-2,54
RIF1 *(receptor-interacting factor 1)*	2,54	1,12	1,21	-2,68	-2,51
CDK5RAP2 *(CDK5 regulatory subunit associated protein 2)*	1,43	0,21	0,14	-2,33	-2,45
BC-2 *(putative breast adenocarcinoma marker (32kD))*	-0,93	-2,87	-2,2	-3,83	-2,41
CUEDC2 *(CUE domain containing 2)*	2,06	0,23	0,8	-3,56	-2,39
COMT *(catechol-O-methyltransferase)*	0,92	-0,26	-0,28	-2,26	-2,29
HSCARG *(HSCARG protein)*	0,39	-0,76	-0,81	-2,22	-2,29
MGC35048 *(hypothetical protein MGC35048)*	0,74	-0,47	-0,46	-2,31	-2,29
BZRP *(benzodiazapine receptor (peripheral))*	2,15	0,84	0,96	-2,48	-2,28
SH3TC1 *(SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1)*	0,07	-1,01	-1,12	-2,12	-2,28
INPPL1 *(inositol polyphosphate phosphatase-like 1)*	1,22	0,16	0,04	-2,08	-2,27
NDUFB2 *(NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 2, 8kDa)*	0,77	-0,39	-0,38	-2,23	-2,23
GPR35 *(G protein-coupled receptor 35)*	1,1	-0,21	-0,04	-2,49	-2,2
ANKRD3 *(ankyrin repeat domain 3)*	-0,98	-2,05	-2,1	-2,1	-2,17
TRADD *(TNFRSF1A-associated via death domain)*	0,09	-1,13	-1,01	-2,33	-2,15
FLJ11016 *(hypothetical protein FLJ11016)*	-0,07	-1,4	-1,17	-2,51	-2,14
PKIG *(protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor gamma)*	0,6	-0,59	-0,47	-2,28	-2,09
STIM1 *(stromal interaction molecule 1)*	1,07	0,06	0,01	-2,02	-2,09
RGS12 *(regulator of G-protein signalling 12)*	3,09	1,84	2,06	-2,38	-2,04
FLJ14249 *(HS1-binding protein 3)*	0,61	-0,46	-0,41	-2,11	-2,03
FUCA1 *(fucosidase, alpha-L- 1, tissue)*	-0,24	-1,46	-1,26	-2,33	-2,03
DUSP10 *(dual specificity phosphatase 10)*	-0,63	0,96	0,39	2,99	2,02
CXorf15 *(chromosome X open reading frame 15)*	-0,27	1,03	0,78	2,46	2,06
ENC1 *(ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)*	0,33	1,77	1,38	2,71	2,06
SF3B4 *(splicing factor 3b, subunit 4, 49kDa)*	-0,06	1,14	0,98	2,3	2,06
ZDHHC6 *(zinc finger, DHHC domain containing 6)*	-1,01	0,04	0,03	2,08	2,06
DGKA *(diacylglycerol kinase, alpha 80kDa)*	-0,76	0,33	0,34	2,13	2,14
HMGCS1 *(3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble))*	-0,14	1,5	1,01	3,12	2,22
DC-TM4F2 *(tetraspanin similar to TM4SF9)*	-0,13	1,29	1,04	2,68	2,25
CAV1 *(caveolin 1, caveolae protein, 22kDa)*	0,18	1,39	1,4	2,31	2,33
UBE2V2 *(ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2)*	-0,73	0,54	0,55	2,42	2,43
PM2-ST0303-002-E07 *(MRNA; cDNA DKFZp686H2244 (from clone DKFZp686H2244))*	-0,47	1,43	0,85	3,72	2,49
LSM3 *(LSM3 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae))*	-0,56	0,52	0,92	2,11	2,79
SET7 *(SET domain-containing protein 7)*	-0,18	1,23	1,37	2,66	2,93
HAT1 *(histone acetyltransferase 1)*	-0,63	0,56	0,96	2,27	3,01
SSA2 *(Sjogren syndrome antigen A2 (60kDa, ribonucleoprotein autoantigen SS-A/Ro))*	-0,28	0,86	1,38	2,2	3,16
SFRS3 *(splicing factor, arginine/serine-rich 3)*	-1,42	0,11	0,29	2,88	3,27
FLJ10074 *(hypothetical protein FLJ10074)*	0,27	1,74	1,98	2,78	3,28
TMC4 *(transmembrane channel-like 4)*	-2,27	-0,75	-0,51	2,86	3,38
LANCL2 *(LanC lantibiotic synthetase component C-like 2 (bacterial))*	-1,6	-0,4	0,16	2,3	3,39
RBBP6 *(retinoblastoma binding protein 6)*	-0,8	0,57	0,98	2,58	3,43

Gene	MDA (m)	MDA. FN(-) (m)	MDA. FN(+) (m)	MDA. FN(-) (Fc)	MDA. FN(+) (Fc)
MADH5 (MAD, mothers against decapentaplegic homolog 5 (Drosophila))	-0,73	0,55	1,05	2,43	3,44
CDH5 *(cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium))*	-0,22	0,99	1,58	2,32	3,48
DNCH1 *(dynein, cytoplasmic, heavy polypeptide 1)*	0,29	2,05	2,15	3,4	3,64
ACSL3 *(acyl-CoA synthetase long-chain family member 3)*	-0,78	1,1	1,15	3,68	3,81
NKTR *(natural killer-tumor recognition sequence)*	-0,13	1,24	1,83	2,58	3,88
UBPH *(similar to ubiquitin binding protein)*	-0,83	0,85	1,14	3,22	3,93
SLC20A1 *(solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1)*	0,14	1,76	2,13	3,08	3,98
C13orf10 *(chromosome 13 open reading frame 10)*	-1,52	0,33	0,5	3,6	4,04
IL6 *(interleukin 6 (interferon, beta 2))*	1,49	3,6	3,96	4,32	5,54

4.1.1 Influência de fibroblastos de linfonodo não comprometido de pacientes com câncer de mama [MDA.FN(-) vs MDA] no perfil da expressão gênica de células MDA-MB231

Dentre os cento e cinqüenta e cinco genes (155) modulados em células MDA-MB231 quando co-cultivadas com fibroblastos de linfonodos não comprometidos, em relação às mesmas células mantidas isoladas, encontramos 83 genes hipoexpressos, cuja variação de expressão foi de 2 à 9,42 vezes. Entre os genes incluem-se FN3K (*fructosamine-3-kinase*), LCN2 (*lipocalin2*), SLC22A18 (*solute carrier family22*), HNMT (*histamine n-methyltransferase*), GPSN2 (*glycoprotein, synaptic 2*) cuja variação de expressão foi ≥ 4 vezes.

Entre os 72 genes hiperexpressos houve uma variação de expressão de 2 à 4,32 vezes. Neste grupo encontram-se IL6 (*interleukin 6*), ACSL3 (*acyl-Coa syntetase long-chain family*), DNCH1 (*dynein, cytoplasmic, heavy polypeptide 1)*, UBPH (*similar to ubiquitin binding protein*), ZNF189 (*zinc finger protein 189*), TOMM20 (*translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog*), HMGCS1 (*3-hydroxy-3methilglutaril-coenzimeA*), DUSP10 (*dual especificity*

phosphatase10), MRPL47 (*mitochondrial ribosomal protein L47*) e ARS2 (*arsenate resistance protein ARS2*), cuja variação foi ≥ 3 vezes (Tabela 9).

Tabela 9. Cento e cinqüenta e cinco genes foram diferencialmente expressos em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo não comprometido.Três ensaios de monocultura de células MDA-MB231 e co-cultura (fibroblastos obtidos de linfonodos não comprometidos de 3 pacientes) independentes foram realizados. Genes diferencialmente expressos foram aqueles em que p ≤0.01 (teste t de *Student*), FDR ≤0.01 e variação de expressão entre grupos ≥2); m: log2 média da expressão gênica de células MDA-MB231/HB4A; Fc:variação de expressão entre os grupos

Gene	MDA.FN (-)/MDA	MDA	Fc
FN3K *(fructosamine-3-kinase)*	-3.82	-0.59	-9.42
LCN2 *(lipocalin 2 (oncogene 24p3)*	-1.32	1.72	-8.22
SLC22A18 *(solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 18)*	-2.55	0.40	-7.72
HNMT *(histamine N-methyltransferase)*	-0.72	1.98	-6.49
GPSN2 *(lycoprotein, synaptic 2)*	-0.99	1.01	-4.00
BC-2 *(putative breast adenocarcinoma marker (32kD))*	-2.87	-0.93	-3.83
GSN (*gelsolin (amyloidosis, Finnish type))*	0.15	2.05	-3.73
PIK3C3 *(phosphoinositide-3-kinase, class 3)*	1.21	3.11	-3.73
RNF141 *(ring finger protein 141)*	1.77	3.63	-3.63
DGAT2 *(diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse))*	-0.95	0.89	-3.57
CUEDC2 *(CUE domain containing 2)*	0.23	2.06	-3.56
KDELR3 *(KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3)*	-0.37	1.38	-3.37
S100P (*S100 calcium binding protein P)*	-4.41	-2.68	-3.32
SNN (*stannin)*	-1.91	-0.20	-3.27
RABAC1 *(Rab acceptor 1 (prenylated))*	-0.34	1.36	-3.24
KIAA0218 *(KIAA0218 gene product)*	-2.06	-0.37	-3.23
TKT *(transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome))*	-0.09	1.58	-3.18
D2S448 *(Melanoma associated gene)*	-0.33	1.28	-3.05
MGC3169 *(hypothetical protein MGC3169)*	0.05	1.65	-3.04
LOC149420 *(casein kinase)*	-0.71	0.86	-2.98
FLJ10521 *(hypothetical protein FLJ10521)*	-0.83	0.71	-2.91
HEG *(HEG homolog)*	-0.61	0.87	-2.78
SCAM-1*(vinexin beta (SH3-containing adaptor molecule-1))*	0.62	2.09	-2.76
GPR56G *(protein-coupled receptor 56)*	-3.35	-1.89	-2.75
TAF12 *(TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa)*	-1.40	0.04	-2.71
RIF1 *(receptor-interacting factor 1)*	1.12	2.54	-2.68
COX5B *(cytochrome c oxidase subunit Vb)*	-1.19	0.22	-2.66
CENTG3 *(centaurin, gamma 3)*	1.31	2.70	-2.62
PSMD8 *(proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8)*	0.02	1.39	-2.59
RHOC *(ras homolog gene family, member C)*	-1.06	0.31	-2.59
VCP *(valosin-containing protein)*	-1.58	-0.21	-2.58
NPEPL1 *(aminopeptidase-like 1)*	-1.85	-0.50	-2.54

Gene	MDA.FN (-)/MDA	MDA	Fc
PIM1 *(pim-1 oncogene)*	-0.43	0.90	-2.51
SSBP2 *(single-stranded DNA binding protein 2)*	-1.23	0.10	-2.51
SOD2 *(superoxide dismutase 2, mitochondrial)*	-0.48	0.84	-2.51
FLJ11016 *(hypothetical protein FLJ11016)*	-1.40	-0.07	-2.51
SMARCD3 *(SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3)*	-1.08	0.24	-2.49
GPR35G *(protein-coupled receptor 35)*	-0.21	1.10	-2.49
BZRP *(benzodiazapine receptor (peripheral))*	0.84	2.15	-2.48
PAK1 *(p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (STE20 homolog, yeast))*	-0.56	0.74	-2.47
MVP *(major vault protein)*	0.74	2.03	-2.44
PARD6 *(Apar-6 partitioning defective 6 homolog alpha (C.elegans))*	-1.84	-0.56	-2.44
KIAA1043 (*KIAA1043 protein)*	-1.37	-0.09	-2.42
FAM32A *(family with sequence similarity 32, member A)*	0.43	1.69	-2.39
UBE2L6 *(ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6)*	0.02	1.28	-2.39
RGS12 *(regulator of G-protein signalling 12)*	1.84	3.09	-2.38
DIBD1 *(disrupted in bipolar affective disorder 1)*	-0.51	0.74	-2.38
MYST1 *(MYST histone acetyltransferase 1)*	-0.63	0.60	-2.35
FUCA1 *(fucosidase, alpha-L- 1, tissue)*	-1.46	-0.24	-2.33
TRADD *(TNFRSF1A-associated via death domain)*	-1.13	0.09	-2.33
CDK5RAP2	0.21	1.43	-2.33
DBN1*(drebrin 1)*	-0.34	0.88	-2.33
MGC35048 *(hypothetical protein MGC35048)*	-0.47	0.74	-2.31
SUFU *(suppressor of fused homolog (Drosophila))*	-0.28	0.92	-2.29
PKIG *(protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor gamma)*	-0.59	0.60	-2.28
P4HB *(procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase; thyroid hormone binding protein p55))*	-0.51	0.67	-2.28
TEF *(thyrotrophic embryonic factor)*	-1.32	-0.14	-2.26
COMT *(catechol-O-methyltransferase)*	-0.26	0.92	-2.26
NDUFB2 *(NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 2, 8kDa)*	-0.39	0.77	-2.23
C6orf4 *(chromosome 6 open reading frame 4)*	-1.65	-0.50	-2.23
CITED2 *(Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2)*	0.49	1.64	-2.22
HSCARG *(HSCARG protein)*	-0.76	0.39	-2.22
WFS1 *(Wolfram syndrome 1 (wolframin))*	-1.21	-0.07	-2.21
C6orf62 *(chromosome 6 open reading frame 62)*	-0.60	0.53	-2.20
FAP *(fibroblast activation protein, alpha)*	-1.51	-0.38	-2.20
NSE1*non-SMC (structural maintenance of chromosomes) element 1 protein)*	-1.32	-0.20	-2.18
PSMD7 *(proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7 (Mov34 homolog))*	0.48	1.58	-2.14
SH3TC1 *(SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1)*	-1.01	0.07	-2.12
LITAF *(lipopolysaccharide-induced TNF factor)*	-0.97	0.11	-2.11
FLJ14249 *(HS1-binding protein 3)*	-0.46	0.61	-2.11
ANKRD3 *(ankyrin repeat domain 3)*	-2.05	-0.98	-2.10
PSMB9 9 *(proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional protease 2))*	-0.31	0.75	-2.09
INPPL1 *(inositol polyphosphate phosphatase-like 1)*	0.16	1.22	-2.08
ETHE1 *(ethylmalonic encephalopathy 1)*	-0.28	0.78	-2.08
ADD3 *(adducin 3 (gamma))*	-1.02	0.02	-2.06
FLJ10597 *(hypothetical protein FLJ10597)*	-0.42	0.62	-2.05
CBLBCas-Br-M *(murine ecotropic retroviral transforming sequence b)*	-0.58	0.46	-2.05

Gene	MDA.FN (-)/MDA	MDA	Fc
PGD *(phosphogluconate dehydrogenase)*	-0.77	0.27	-2.04
RFXANK *(regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein)*	-0.35	0.67	-2.04
AKAP8LA *(kinase (PRKA) anchor protein 8-like)*	-0.39	0.64	-2.03
STIM1 (*stromal interaction molecule 1)*	0.06	1.07	-2.02
CDW92 *(CDW92 antigen)*	-2.28	-1.27	-2.01
STOML2 *(stomatin (EPB72)-like 2)*	0.08	1.09	-2.01
GCH1 *(GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia))*	-1.39	-2.39	2.00
KIAA0217	0.97	-0.03	2.00
CTCFC *(CCTC-binding factor (zinc finger protein))*	0.24	-0.77	2.02
DDX21DEAD *(Asp-Glu-Ala-Asp box polypeptide 21)*	0.89	-0.15	2.06
ZDHHC6 *(zinc finger, DHHC domain containing 6)*	0.04	-1.01	2.08
C20orf6 *(chromosome 20 open reading frame 6)*	1.00	-0.06	2.08
LMAN2L *(lectin, mannose-binding 2-like)*	0.72	-0.34	2.09
LSM3L *(SM3 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae))*	0.52	-0.56	2.11
PRKRIR *(protein-kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent inhibitor, repressor of (P58 repressor))*	-1.44	-2.53	2.13
DGKA *(diacylglycerol kinase, alpha 80kDa)*	0.33	-0.76	2.13
USP1 *(ubiquitin specific protease 1)*	0.24	-0.86	2.15
IL4R *(interleukin 4 receptor)*	1.95	0.84	2.16
SOAT1 *(sterol O-acyltransferase (acyl-Coenzyme A: cholesterol acyltransferase) 1)*	1.32	0.20	2.17
SH3BP4 *(SH3-domain binding protein 4)*	0.76	-0.36	2.17
SSA2S *(jogren syndrome antigen A2 (60kDa, ribonucleoprotein autoantigen SS-A/Ro))*	0.86	-0.28	2.20
LOC129642 *(hypothetical protein BC016005)*	0.33	-0.81	2.20
TFDP1 *(transcription factor Dp-1)*	-0.66	-1.80	2.21
PTPN11 (*transcription factor Dp-1)*	0.62	-0.55	2.25
CUL3 *(cullin 3)*	0.49	-0.68	2.25
PPP3C *(Aprotein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform (calcineurin A alpha))*	0.95	-0.22	2.25
HAT1 *(histone acetyltransferase 1)*	0.56	-0.63	2.27
RBPSUH *(recombining binding protein suppressor of hairless (Drosophila))*	-0.04	-1.23	2.29
LANCL2 *(LanC lantibiotic synthetase component C-like 2 (bacterial))*	-0.40	-1.60	2.30
SF3B4 *(splicing factor 3b, subunit 4, 49kDa)*	1.14	-0.06	2.30
LOC511 *(36PTD016 protein)*	0.06	-1.15	2.31
E2F3 *(E2F transcription factor 3)*	0.91	-0.29	2.31
CAV1 *(caveolin 1, caveolae protein, 22kDa)*	1.39	0.18	2.31
SRPRB *(signal recognition particle receptor, B subunit)*	-0.29	-1.50	2.32
CDH5 *(cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium))*	0.99	-0.22	2.32
EHHADH *(enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase)*	0.89	-0.33	2.33
FOXP1 *(forkhead box P1)*	2.86	1.60	2.39
SORT1 *(sortilin 1)*	1.21	-0.05	2.40
UBE2V2 *(ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2)*	0.54	-0.73	2.42
MADH5 *(MAD, mothers against decapentaplegic homolog 5 (Drosophila))*	0.55	-0.73	2.43
BCL7BB-*cell (CLL/lymphoma 7B)*	1.16	-0.12	2.43
PSME4 *(proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4)*	0.92	-0.38	2.46
CXorf15 *(chromosome X open reading frame 15)*	1.03	-0.27	2.46
ABCE1 *(ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1)*	0.47	-0.86	2.52
PHTF1 *(putative homeodomain transcription factor 1)*	-0.19	-1.54	2.55

Gene	MDA.FN (-)/MDA	MDA	Fc
NKTR *(natural killer-tumor recognition sequence)*	1.24	-0.13	2.58
RBBP6 *(retinoblastoma binding protein 6)*	0.57	-0.80	2.58
PIAS3 (*protein inhibitor of activated STAT3)*	0.21	-1.17	2.59
SET7 *(SET domain-containing protein 7)*	1.23	-0.18	2.66
DC-TM4F2 *(tetraspanin similar to TM4SF9)*	1.29	-0.13	2.68
ENC1*(ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain))*	1.77	0.33	2.71
TM4SF10 *(transmembrane 4 superfamily member 10)*	1.34	-0.10	2.71
TGFB2 *(transforming growth factor, beta 2)*	2.24	0.78	2.75
RC1-IT0013-022-C08 *(CDNA FLJ31353 fis, clone MESAN2000264)*	0.31	-1.15	2.75
FLJ10074 *(hypothetical protein FLJ10074)*	1.74	0.27	2.78
QV3-DT0045-063-F01	2.31	0.84	2.78
FLJ32421 *(hypothetical protein FLJ32421)*	-0.54	-2.04	2.83
KHDRBS3KH *(domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3)*	0.42	-1.08	2.83
TMC4 (*transmembrane channel-like 4)*	-0.75	-2.27	2.86
SFRS3 *(splicing factor, arginine/serine-rich 3)*	0.11	-1.42	2.88
SLC7A5 *(solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5)*	0.32	-1.22	2.91
CYP1B1 *(cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1)*	0.90	-0.66	2.95
HYPK *(Huntingtin interacting protein K)*	0.89	-0.68	2.95
DUSP10 *(dual specificity phosphatase 10)*	0.96	-0.63	2.99
ARS2 (*arsenate resistance protein ARS2)*	1.32	-0.29	3.04
MRPL47 *(mitochondrial ribosomal protein L47)*	0.53	-1.08	3.06
TOMM20 *(translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast))*	1.31	-0.31	3.06
SLC20A1 *(solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1)*	1.76	0.14	3.08
HMGCS1(*3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble))*	1.50	-0.14	3.12
ZNF189 *(zinc finger protein 189)*	-0.04	-1.72	3.21
UBPH (*similar to ubiquitin binding protein)*	0.85	-0.83	3.22
DNCH1 *(dynein, cytoplasmic, heavy polypeptide 1)*	2.05	0.29	3.40
H41 *(hypothetical protein H41)*	0.01	-1.79	3.48
OSR2 *(odd-skipped-related 2A protein)*	0.88	-0.93	3.50
C13orf10 *(chromosome 13 open reading frame 10)*	0.33	-1.52	3.60
ACSL3 *(acyl-CoA synthetase long-chain family member 3)*	1.10	-0.78	3.68
PM2-ST0303-002-E0*(7MRNA; cDNA DKFZp686H2244 (from clone DKFZp686H2244))*	1.43	-0.47	3.72
E2F (*transcription factor 3)*	3.60	1.49	4.32

Quatorze funções foram moduladas em células MDA-MB231 pela presença de fibroblastos de linfonodo não comprometido como regulação do ciclo celular e regulação positiva da proliferação celular. Além disto, observamos que 5 genes como LITAF, TEF, SMARCD3, CITED2 e SOD2 foram hipoexpressos em células MDA-MB231 em co-cultura, os quais atuam na regulação da transcrição por promotores da RNA polimerase (Tabela 10).

Tabela 10. Categorias funcionais (processos biológicos) moduladas em células MDA-MB231 na presença de fibroblastos de linfonodo não comprometido. Foi utilizado o programa *Onto Express*, que considera os genes diferencialmente expressos em relação aos genes imobilizados na lâmina. Estão listadas apenas as funções onde pelo menos dois genes foram regulados e pelo menos quatro genes envolvidos na função estavam imobilizados na lâmina ($p \leq 0,05$)

Processos biológicos	Genes hiperexpressos	Genes hipoexpressos	Referência
Resposta humoral imune	IL6	RFXANK	4
Troca gasosa na respiração		COX5B HNMT	4
Regulação da transcrição por promotores da RNA polimerase II	TFDP1	LITAF SOD2 TEF SMARCD3 CITED2	40
Desenvolvimento cerebral		CDK5RAP2 GPR56	7
Regulação positiva da cascata de-kappaB kinase/NF-kappaB	SLC20A1	LITAF TRADD RHOC	28
Regulação positiva da proliferação celular	TGFB2 IL6 CUL3	STIM1	29
Geração de metabólitos precursores e energia	EHHADH	WFS1	11
Cascata JNK	DUSP10	PAK1	11
Resposta ao estresse	DUSP10 PRKRIR	SNN	22
Ciclo celular	SH3BP4 CTCF E2F3 TFDP1 CUL3	RIF1 SUFU STIM1 PARD6A	127
Metabolismo de lipídios	SOAT1 HMGCS1 ACSL3		51
Splicing mRNA , via spliceossoma	SF3B4 LSM3 SFRS3		32
Regulação da progressão do ciclo celular	E2F3 TFDP1 UBE2V2 RBBP6	PSMD8	71
Percepção sensorial do som	PTPN11	WFS1	22

Observamos que as células MDA-MB231 adquirem perfil gênico característico quando na presença de fibroblastos, pois a análise do agrupamento hierárquico não supervisionado foi capaz de separar as células MDA-MB231 co-cultivadas com os fibroblastos de linfonodos não comprometidos das células MDA-MB231 cultivadas isoladamente (Figura 12)

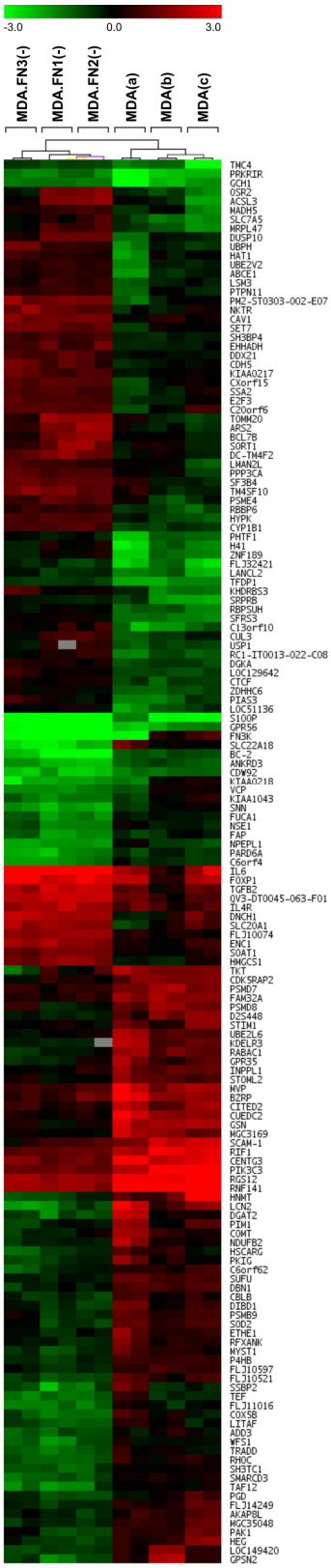


Figura 12. Agrupamento hierárquico não supervisionado de células MDA-MB231 após co-cultura com fibroblastos de linfonodo não comprometido e células MDA-MB231 cultivadas isoladamente. O perfil da expressão gênica foi avaliado em ensaios de cDNA *microarray* com *dye swap* utilizando a célula Hb4A como referência. As células da matriz representam à expressão relativa sendo verde, menos expresso na amostra alvo em relação à célula referência e vermelho mais expresso. Dois grupos foram facilmente reconhecidos, um das células MDA-MB231 cultivadas isoladamente e outro das células em co-cultura com fibroblastos de linfonodo não comprometido.
As cores representam o grau de confiabilidade (Preto=100%;Cinza=90-100%;Azul=80-90%;Verde=70-80%;Amarelo=60-70%;Laranja=50-60%;Rosa=0-50%;Vermelho=0%)

4.1.2 Influência de fibroblastos de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama [MDA.FN(+) vs MDA] no perfil da expressão gênica de células MDA-MB231

Cento e oitenta e oito (188) genes foram diferencialmente expressos em células MDA-MB231 quando mantidas em co-cultura com fibroblastos de linfonodos comprometidos, em relação às células cultivadas isoladamente, sendo 99 deles hipoexpressos e 89 hiperexpressos (Tabela 11). Dentre os genes hipoexpressos houve uma variação de expressão de 2,01 à 13,55 vezes, incluindo os genes HNMT (*hystamine n-methyltransferase*), LCN2 (*lipocalin 2)*, SYNGR3 (*synaptogyrin 3*), ZNF19 (*zinc finger protein 19*), PIM (*pim-1 oncogene*) e PBXIP1 (*pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein1*), cuja variação de expressão foi ≥ 5 vezes. Entre os genes hiperexpressos houve uma variação de expressão de 2,01 à 5,96, incluindo-se SERPINB2 (*serine proteinase inhibitor, clade B*),IL6 (*interleukin 6*) e STK3 (*serine threonine kinase 3*) cuja variação de expressa foi ≥ 5 vezes.

Tabela 11. Cento e oitenta e oito genes foram diferencialmente expressos em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo comprometido.Três ensaios de monocultura de células MDA-MB231 e co-cultura (fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos de 3 pacientes) independentes foram realizados. Genes diferencialmente expressos foram aqueles em que p ≤0.01 (teste t de *Student*), FDR ≤0.01 e variação de expressão entre grupos ≥2); m: log2 média da expressão gênica de células MDA-MB231/HB4A; Fc:variação de expressão entre os grupos

Gene	MDA.FN (+) m	MDA (m)	Fc
HNMT *(histamine N-methyltransferase)*	-1.78	1.98	-13.55
LCN2 *(lipocalin 2 (oncogene 24p3))*	-1.27	1.72	-7.94
SLC22A18 *(solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 18)*	-2.33	0.40	-6.63
SYNGR3 *(synaptogyrin 3)*	-0.86	1.59	-5.48
ZNF19 *(zinc finger protein 19 (KOX 12))*	-1.17	1.23	-5.28
PIM *(1pim-1 oncogene)*	-1.48	0.90	-5.22
PBXIP1 *(PBXIP1)*	-1.20	1.15	-5.10
TKT *(transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome))*	-0.65	1.58	-4.70
GALCS	-1.20	0.99	-4.56

Gene	MDA.FN (+) m	MDA (m)	Fc
SMARCD3 *(SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3)*	-1.88	0.24	-4.34
DPP4 (*dipeptidylpeptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2))*	-0.49	1.61	-4.30
C6orf62 *(chromosome 6 open reading frame 62)*	-1.47	0.53	-4.01
SNN *(stannin)*	-2.16	-0.20	-3.89
SPINT2 *(serine protease inhibitor, Kunitz type, 2)*	-1.71	0.23	-3.85
TEF *(thyrotrophic embryonic factor)*	-2.05	-0.14	-3.76
D2S448 *(Melanoma associated gene)*	-0.62	1.28	-3.73
VCP *(valosin-containing protein)*	-2.05	-0.21	-3.57
MGC3169 *(hypothetical protein MGC3169)*	-0.11	1.65	-3.38
RHOC *(ras homolog gene family, member C)*	-1.43	0.31	-3.35
IRF7 *(interferon regulatory factor 7)*	1.05	2.71	-3.16
PTPRH *(protein tyrosine phosphatase, receptor type, H)*	-1.36	0.29	-3.13
RABAC1 *(Rab acceptor 1 (prenylated))*	-0.25	1.36	-3.04
AHSA1 *(AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast))*	-0.34	1.27	-3.04
FLJ10521 *(hypothetical protein FLJ10521)*	-0.89	0.71	-3.04
CENTG3 (*centaurin, gamma 3)*	1.10	2.70	-3.03
NPEPL1 *(aminopeptidase-like 1)*	-2.09	-0.50	-3.00
LZTS2 *(leucine zipper, putative tumor suppressor 2)*	-0.28	1.29	-2.96
TRPC4AP *(transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 associated protein)*	0.02	1.58	-2.94
ODC-*pornithine decarboxylase-like*	-0.56	1.00	-2.94
PP2135 *(PP2135 protein)*	-1.52	0.02	-2.92
KIAA0218 *(KIAA0218 gene product)*	-1.90	-0.37	-2.89
GPR56G *(protein-coupled receptor 56)*	-3.41	-1.89	-2.87
TOM1L*2 (target of myb1-like 2 (chicken))*	-1.23	0.28	-2.85
RNF141 *(ring finger protein 141)*	2.13	3.63	-2.83
P4HB *(procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase; thyroid hormone binding protein p55))*	-0.83	0.67	-2.83
CDW92 *(CDW92 antigen)*	-2.76	-1.27	-2.81
PFDN2 *(prefoldin 2)*	-0.43	1.06	-2.80
PTK2B *(PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta)*	-0.01	1.48	-2.80
DBN1 *(drebrin 1)*	-0.60	0.88	-2.80
ADFP *(adipose differentiation-related protein)*	1.71	3.19	-2.79
PIK3C3 *(phosphoinositide-3-kinase, class 3)*	1.63	3.11	-2.79
C10orf10 *(chromosome 10 open reading frame 10)*	-0.02	1.46	-2.79
ATP5G2 *(ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 2)*	-0.84	0.64	-2.77
LY6G5B *(lymphocyte antigen 6 complex, locus G5B)*	-1.81	-0.36	-2.73
CTL2 *(CTL2 gene)*	-2.03	-0.58	-2.73
KDELR3 *(KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3)*	0.00	1.38	-2.61
vinexin beta *(SH3-containing adaptor molecule-1)*	0.72	2.09	-2.58
PARD6*A (par-6 partitioning defective 6 homolog alpha (C.elegans))*	-1.92	-0.56	-2.58
CPD (*carboxypeptidase D)*	0.33	1.68	-2.55
SUFU *(suppressor of fused homolog (Drosophila))*	-0.43	0.92	-2.54

Gene	MDA.FN (+) m	MDA (m)	Fc
PROS1 *(protein S (alpha))*	-3.04	-1.70	-2.53
RIF1 *(receptor-interacting factor 1)*	1.21	2.54	-2.51
TM7SF3 *(transmembrane 7 superfamily member 3)*	-1.34	-0.02	-2.50
TMEM8 *(transmembrane protein 8 (five membrane-spanning domains))*	-0.55	0.75	-2.46
CDKN2D *(cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4))*	0.86	2.16	-2.46
CDK5RAP2 *(CDK5 regulatory subunit associated protein 2)*	0.14	1.43	-2.45
INAD*L (InaD-like protein)*	-1.70	-0.42	-2.42
BC-2 *(putative breast adenocarcinoma marker (32kD))*	-2.20	-0.93	-2.41
NSE2 *(breast cancer membrane protein 101)*	-3.20	-1.94	-2.39
CUEDC2 *(CUE domain containing 2)*	0.80	2.06	-2.39
DAG1 *(dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1))*	-1.48	-0.24	-2.36
KIAA0676	-0.99	0.23	-2.32
DKFZP434K04*6 (hypothetical protein DKFZp434K046)*	-2.20	-0.99	-2.32
KIAA1522	-0.83	0.38	-2.31
TESK1 *(testis-specific kinase 1)*	0.01	1.21	-2.30
MGC35048 *(hypothetical protein MGC35048)*	-0.46	0.74	-2.29
HSCARG *(HSCARG protein)*	-0.81	0.39	-2.29
COMT *(catechol-O-methyltransferase)*	-0.28	0.92	-2.29
LOC56965 *(hypothetical protein from EUROIMAGE 1977056)*	-1.33	-0.14	-2.29
SH3TC*1 (SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1)*	-1.12	0.07	-2.28
PRSS11 *(protease, serine, 11 (IGF binding))*	3.04	4.23	-2.28
BZRP *(benzodiazapine receptor (peripheral))*	0.96	2.15	-2.28
INPPL1 *(inositol polyphosphate phosphatase-like 1)*	0.04	1.22	-2.27
FLJ10055 *(hypothetical protein FLJ10055)*	0.84	2.02	-2.26
HLA-F *(major histocompatibility complex, class I, F)*	1.50	2.67	-2.25
RPS6KA1 *(ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1)*	-0.08	1.08	-2.24
NDUFB2 *(NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 2, 8kDa)*	-0.38	0.77	-2.23
ITGB5 *(integrin, beta 5)*	-1.62	-0.47	-2.21
GPR35G *(protein-coupled receptor 35)*	-0.04	1.10	-2.20
FTHFSDC1 *(formyltetrahydrofolate synthetase domain containing 1)*	-2.14	-1.01	-2.19
ANKRD3 *(ankyrin repeat domain 3)*	-2.10	-0.98	-2.17
TRADD *(TNFRSF1A-associated via death domain)*	-1.01	0.09	-2.15
KATNB*1 (katanin p80 (WD repeat containing) subunit B 1)*	-0.09	1.01	-2.14
FLJ11016 *(hypothetical protein FLJ11016)*	-1.17	-0.07	-2.14
PKIG *(protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor gamma)*	-0.47	0.60	-2.09
STIM1 *(stromal interaction molecule 1)*	0.01	1.07	-2.09
LPIN2 *(lipin 2)*	-0.36	0.70	-2.08
CTSH *(cathepsin H)*	-1.88	-0.84	-2.06
FBXW1 *(BF-box and WD-40 domain protein 1B)*	-1.04	0.00	-2.06
CCM2 (*cerebral cavernous malformation 2)*	0.52	1.55	-2.04
RGS12 (*regulator of G-protein signalling 12)*	2.06	3.09	-2.04
FLJ14249 *(HS1-binding protein 3)*	-0.41	0.61	-2.03
FUCA1 *(fucosidase, alpha-L- 1, tissue)*	-1.26	-0.24	-2.03
PRKCZ *(protein kinase C, zeta)*	-0.93	0.09	-2.03

Gene	MDA.FN (+) m	MDA (m)	Fc
SORBS1 *(sorbin and SH3 domain containing 1)*	-0.55	0.46	-2.02
FLJ13710 *(hypothetical protein FLJ13710)*	-0.32	0.69	-2.02
SPPL3 *(signal peptide peptidase 3)*	-1.30	-0.29	-2.02
USP20 *(ubiquitin specific protease 20)*	-0.07	0.94	-2.01
PLA2G5 *(phospholipase A2, group V)*	-1.80	-0.79	-2.01
TARDB *(PTAR (DNA binding protein))*	0.95	-0.06	2.01
DUSP10 *(dual specificity phosphatase 10)*	0.39	-0.63	2.02
C1GALT2 *(core 1 UDP-galactose:N-acetylgalactosamine-alpha-R beta 1,3-galactosyltransferase 2)*	0.58	-0.44	2.03
PIR51 *(RAD51-interacting protein)*	-0.90	-1.92	2.03
GABRB3 *(gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 3)*	1.14	0.11	2.04
RAB8A *(RAB8A, member RAS oncogene family)*	1.19	0.15	2.05
SF3B4 *(splicing factor 3b, subunit 4, 49kDa)*	0.98	-0.06	2.06
CXorf15 *(chromosome X open reading frame 15)*	0.78	-0.27	2.06
ZDHHC6 *(zinc finger, DHHC domain containing 6)*	0.03	-1.01	2.06
ENC1 *(ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain))*	1.38	0.33	2.06
TIE *(tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains)*	1.15	0.10	2.07
TACR2 *(tachykinin receptor 2)*	0.23	-0.84	2.10
ODC1 *(ornithine decarboxylase 1)*	1.67	0.60	2.10
C7orf36 *(chromosome 7 open reading frame 36)*	0.02	-1.06	2.12
DGKA *(diacylglycerol kinase, alpha 80kDa)*	0.34	-0.76	2.14
CIRH1A *(cirrhosis, autosomal recessive 1A (cirhin))*	0.63	-0.46	2.14
LOC54499 *(putative membrane protein)*	0.14	-0.96	2.15
SLC16A14 *(solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 14)*	0.13	-1.00	2.18
PP784 *(PP784 protein)*	-0.77	-1.92	2.22
KIDINS220 *(likely homolog of rat kinase D-interacting substance of 220 kDa)*	0.37	-0.78	2.22
CPNE1 *(copine I)*	0.66	-0.49	2.22
HMGCS1*(3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble))*	1.01	-0.14	2.22
C3orf4 *(chromosome 3 open reading frame 4)*	1.61	0.46	2.22
SFRS6 *(splicing factor, arginine/serine-rich 6)*	0.47	-0.69	2.23
SPEC2 *(non-kinase Cdc42 effector protein SPEC2)*	-1.25	-2.41	2.23
DC-TM4F2 *(tetraspanin similar to TM4SF9)*	1.04	-0.13	2.25
TSGA14 *(testis specific, 14)*	0.96	-0.21	2.26
TPX2 *(TPX2 microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis))*	0.80	-0.41	2.31
KEL *(Kell blood group)*	1.18	-0.03	2.32
CAV1 *(caveolin 1, caveolae protein, 22kDa)*	1.40	0.18	2.33
TEKT3 *(tektin 3)*	0.39	-0.84	2.33
PAK6 *(p21(CDKN1A)-activated kinase 6)*	0.61	-0.62	2.36
TORC3 *(transducer of regulated cAMP response element-binding protein (CREB) 3)*	0.40	-0.85	2.38
UBE2V2 *(ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2)*	0.55	-0.73	2.43
CSTF3 *(cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 3, 77kDa)*	1.14	-0.14	2.44
AMD1 *(adenosylmethionine decarboxylase 1)*	0.76	-0.55	2.46
PM2-ST0303-002-E07	0.85	-0.47	2.49
FLJ22794	0.59	-0.74	2.51
HNRPH3 *(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9))*	0.61	-0.72	2.53
KIAA0020	1.20	-0.14	2.53

Gene	MDA.FN (+) m	MDA (m)	Fc
UBE1C *(ubiquitin-activating enzyme E1C (UBA3 homolog, yeast))*	0.84	-0.52	2.56
TLOC1 *(translocation protein 1)*	1.21	-0.15	2.57
VPS26 *(vacuolar protein sorting 26 (yeast))*	1.22	-0.16	2.61
CCT5 *(chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon))*	1.25	-0.14	2.62
SFRS2 *(splicing factor, arginine/serine-rich 2)*	0.02	-1.37	2.62
MDS025 *(hypothetical protein MDS025)*	0.56	-0.84	2.64
KNSL7 *(kinesin-like 7)*	1.29	-0.12	2.65
KIAA0483	0.83	-0.58	2.66
AKAP11 *(N-myc (and STAT) interactor)*	-0.04	-1.49	2.74
NMIN-myc *(and STAT) interactor*	-0.67	-2.12	2.74
KIAA1279	1.10	-0.37	2.76
MGC17943 (*hypothetical protein MGC17943)*	0.40	-1.07	2.77
THBS1 *(thrombospondin 1)*	1.37	-0.11	2.78
LSM3L *(SM3 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae))*	0.92	-0.56	2.79
NUCB2 *(nucleobindin 2)*	1.29	-0.21	2.84
IRA1 *(likely ortholog of mouse IRA1 protein)*	0.47	-1.04	2.85
COPS5 *(COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5 (Arabidopsis))*	0.91	-0.61	2.87
CSNK1D *(casein kinase 1, delta)*	0.97	-0.56	2.89
CML66 *(chronic myelogenous leukemia tumor antigen 66)*	1.30	-0.24	2.90
SET7 *(SET domain-containing protein 7)*	1.37	-0.18	2.93
HAT1 *(histone acetyltransferase 1)*	0.96	-0.63	3.01
GDI2 *(GDP dissociation inhibitor 2)*	1.71	0.10	3.06
SOX17SRY *(sex determining region Y-box 17)*	0.46	-1.16	3.08
FBXL14 *(F-box and leucine-rich repeat protein 14)*	2.19	0.56	3.10
SSA2S *(jogren syndrome antigen A2 (60kDa, ribonucleoprotein autoantigen SS-A/Ro))*	1.38	-0.28	3.16
SFRS3 *(splicing factor, arginine/serine-rich 3)*	0.29	-1.42	3.27
FLJ10074 *(hypothetical protein FLJ10074)*	1.98	0.27	3.28
TMC4 *(transmembrane channel-like 4)*	-0.51	-2.27	3.38
LANCL2 *(LanC lantibiotic synthetase component C-like 2 (bacterial))*	0.16	-1.60	3.39
DDX52DEAD *(Asp-Glu-Ala-Asp box polypeptide 52)*	1.63	-0.14	3.40
RBBP6 *(retinoblastoma binding protein 6)*	0.98	-0.80	3.43
FLJ11106 *(hypothetical protein FLJ11106)*	1.32	-0.46	3.44
MADH5 *(MAD mothers against decapentaplegic homolog 5 (Drosophila))*	1.05	-0.73	3.44
SPEC1 *(small protein effector 1 of Cdc42)*	1.70	-0.10	3.48
CDH5 *(cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium))*	1.58	-0.22	3.48
NEDD4L *(neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like)*	1.50	-0.30	3.49
DNCH1 (*dynein, cytoplasmic, heavy polypeptide 1)*	2.15	0.29	3.64
AREG *(amphiregulin (schwannoma-derived growth factor))*	3.94	2.04	3.73
ACSL3 *(acyl-CoA synthetase long-chain family member 3)*	1.15	-0.78	3.81
NKTR *(natural killer-tumor recognition sequence)*	1.83	-0.13	3.88
PSMA5 *(proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5)*	0.82	-1.15	3.93
UBPH *(similar to ubiquitin binding protein)*	1.14	-0.83	3.93
FRAS1 *(Fraser syndrome 1)*	2.09	0.10	3.97
SLC20A1 *(solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1)*	2.13	0.14	3.98
C13orf10 *(chromosome 13 open reading frame 10)*	0.50	-1.52	4.04

Gene	MDA.FN (+) m	MDA (m)	Fc
HECTD1 *(HECT domain containing 1)*	1.48	-0.69	4.49
STK3 *(serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast))*	1.63	-0.69	5.00
IL6 *(interleukin 6 (interferon, beta 2))*	3.96	1.49	5.54
SERPINB2 *(serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2)*	2.77	0.19	5.96

Algumas funções foram reguladas em células MDA-MB231 pela presença de fibroblastos de linfonodos comprometidos incluindo transcrição, regulação da transcrição, DNA-dependente e *splicing de mRNA,* via spliceossoma (Tabela 12)

Tabela 12. Categorias funcionais (processos biológicos) moduladas em células MDA-MB231 na presença de fibroblastos de linfonodo comprometido. Foi utilizado o programa *Onto Express*, que considera os genes diferencialmente expressos em relação aos genes imobilizados na lâmina. Estão listadas apenas as funções onde pelo menos dois genes foram regulados e pelo menos quatro genes envolvidos na função estavam imobilizados na lâmina ($p \leq 0,05$)

Processos biológicos	Genes hiperexpressos	Genes hipoexpressos	Referência
Splicing de mRNA, via spliceossoma	SF3B4 LSM3 HNRPH3 TARDBP SFRS6 SFRS3 SFRS2		32
Regulação da transcrição, DNA-dependente	SOX17 TARDBP	ZNF19 IRF7	375
Processamento de antígeno, via MHC classe I		TRPC4AP HLA-F	4
Resposta ao estresse	DUSP10	AHSA1 SNN PTK2B	22
Desenvolvimento cerebral		CDK5RAP2 GPR56	7
Resposta a estímulos a danos no DNA		RIF1 IRF7	7
Proteínas alvos	TLOC1	KATNB1	8
Excreção	TACR2 NEDD4L		9
splicing RNA	SF3B4 HNRPH3 SFRS2		21
Transcrição	SOX17 TARDBP	TEF ZNF19 SMARCD3 IRF7	315
ubiquitinização de proteínas	NEDD4L	VCP	12
Regulação da atividade da GTPase	GDI2	CENTG3	13

A análise do agrupamento hierárquico não supervisionado, utilizando a expressão diferencial destes cento e oitenta e oito (188) genes, foi capaz de separar em dois grupos, as células MDA-MB231 co-cultivadas com os fibroblastos de linfonodos comprometidos das células cultivadas isoladamente (Figura 13).

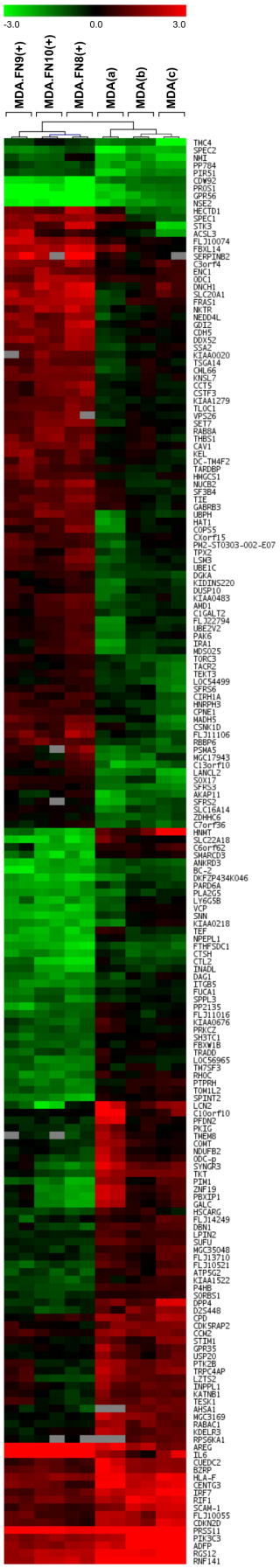


Figura 13. Agrupamento hierárquico não supervisionado de células MDA-MB231 após co-cultura com fibroblastos de linfonodo comprometido e células MDA-MB231 cultivadas isoladamente. O perfil da expressão gênica foi avaliado em ensaios de cDNA *microarray* com *dye swap* utilizando a célula Hb4A como referência. As células da matriz representam à expressão relativa sendo verde, menos expresso na amostra alvo em relação à célula referência e vermelho mais expresso. Dois grupos foram facilmente reconhecidos, um das células MDA-MB231 cultivadas isoladamente e outro das células em co-cultura com fibroblastos de linfonodo comprometido.
As cores representam o grau de confiabilidade (Preto=100%;Cinza=90-100%;Azul=80-90%;Verde=70-80%;Amarelo=60-70%;Laranja=50-60%;Rosa=0-50%;Vermelho=0%)

4.1.3 Genes cuja expressão foi analisada por RT-PCR

Foram selecionados 8 genes para análise de sua expressão por RT-PCR: HNMT (*histamine-N-methyltransferase*), IL6 (*interleukin 6)*, PAK1 (p21 activated *kinase 1*), PRSS11 *(protease serine 11*), FN3K (*fructosamine-3-kinase),* COMT (*catechol-o-methyltransferase)*, SOD2 (*superoxide dismutase 2*) e LCN2 (*lipocalin 2*). Os critérios para seleção destes genes foram através de análise matemática identificados como diferencialmente expressos por cDNA microarray, sendo $p \leq 0,01$, FDR $p \leq 0,01$ e uma variação de expressão entre grupos ≥ 2.

Avaliamos agora a expressão dos genes alvo em células MDA-MB231 as quais foram co-cultivadas na presença de fibroblastos.

Utilizamos então, 5 amostras de fibroblastos de linfonodo não comprometido obtidos de 5 diferentes pacientes sendo que 3 delas foram previamente analisadas por *cDNA microarray* (pacientes 1, 2 e 3). Novos ensaios de co-cultura foram realizados e na tentativa de minimizar os efeitos da cultura sob a expressão gênica de células MDA-MB231, efetuamos 2-3 ensaios independentes de co-cultura, utilizando duas a três passagens consecutivas de células MDA-MB231 e fibroblastos. A seguir, efetuamos a combinação de iguais quantidades de RNA de células MDA-MB231 obtidas dos 2 – 3 ensaios de culturas consecutivas, estabelecendo um *pool* de amostras de células MDA-MB231 (as quais foram mantidas em co-cultura com fibroblastos de uma paciente específica). O mesmo foi realizado com células MDA-MB231 quando co-cultivadas com fibroblastos de linfonodos comprometidos. As células MDA-MB231 isoladas foram obtidas em 3 ensaios independentes e foram usadas nas comparações.

Para determinar se diferentes linhagens de câncer de mama se comportam da mesma maneira, analisamos também a expressão gênica de outra linhagem de câncer de mama, a MCF-7. Estas células foram co-cultivadas com fibroblastos de linfonodos não comprometidos, comprometidos ou cultivadas isoladamente para comparação.

Inicialmente determinamos se havia correlação entre a expressão gênica, avaliada por *cDNA microarray* e por RT-PCR em Tempo Real. Observamos uma correlação positiva na expressão gênica de todos os genes avaliados, como mostra a tabela 13. SOD2 apresentou correlação positiva significativa entre os diferentes ensaios.

Observamos que a expressão de FN3K foi menor em células MDA-MB231 co-cultivadas com fibroblastos em relação às células cultivadas isoladamente, e está de acordo com dados obtidos por *cDNA microarray* (Figura 15 E).

Em relação à expressão de COMT, observamos que esta foi mais baixa em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo comprometido e que houve tendência a ser mais baixa em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo não comprometido, confirmando os dados de *cDNA microarray* (Figura 15 F). Houve também uma tendência a uma menor expressão de SOD2 em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo não comprometido, em similaridade aos ensaios prévios de *cDNA microarray* (Figura 15 G).

Não confirmamos a expressão diferencial de HNMT, IL6, PAK1, PRSS11 e LCN2 entre células MDA-MB231 mantidas isoladamente ou na presença de fibroblastos (Figura 14 A, B, C, D e 15 H).

Avaliamos também a expressão destes genes em células MCF-7 e observamos menor expressão de HTRA1 (ou PRSS11) na presença de fibroblastos de ambas as origens (linfonodo comprometido e não comprometido) (Figura 18 D). Houve também tendência à expressão diferencial de SOD2 e LCN2 em células MCF-7 co-cultivadas com fibroblastos em relação às células mantidas em cultura isoladamente, entretanto, esta variação de expressão foi em sentido contrário ao previamente observado em células MDA-MB231 (Figura 19 G e 19 H). Não detectamos expressão diferencial de HNMT, IL6, PAK1, FN3K, COMT em células MCF-7 (Figura 18 A, B, C e 19 E e F).

Tabela 13. Correlação da expressão gênica avaliada por *cDNA microarray* ou RT-PCR em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos ou cultivadas isoladamente. Foram analisadas nove amostras de células MDA-MB231 (3 monoculturas, 3 co-culturas com fibroblastos de linfonodos não comprometidos e 3 co-culturas com fibroblastos de linfonodos comprometidos). As amostras de células MDA-MB231 usadas nos diferentes ensaios foram obtidas em tempos diferentes. R= coeficiente de correlação; *Correlação de Spearman.*

Genes	R	P
HNMT	0.350	0.356
IL6	0.033	0.932
PAK1	0.383	0.308
PRSS11	0.017	0.966
FN3K	0.433	0.244
COMT	0.450	0.224
SOD2	0.850	0.004*
LCN2	0.069	0.860

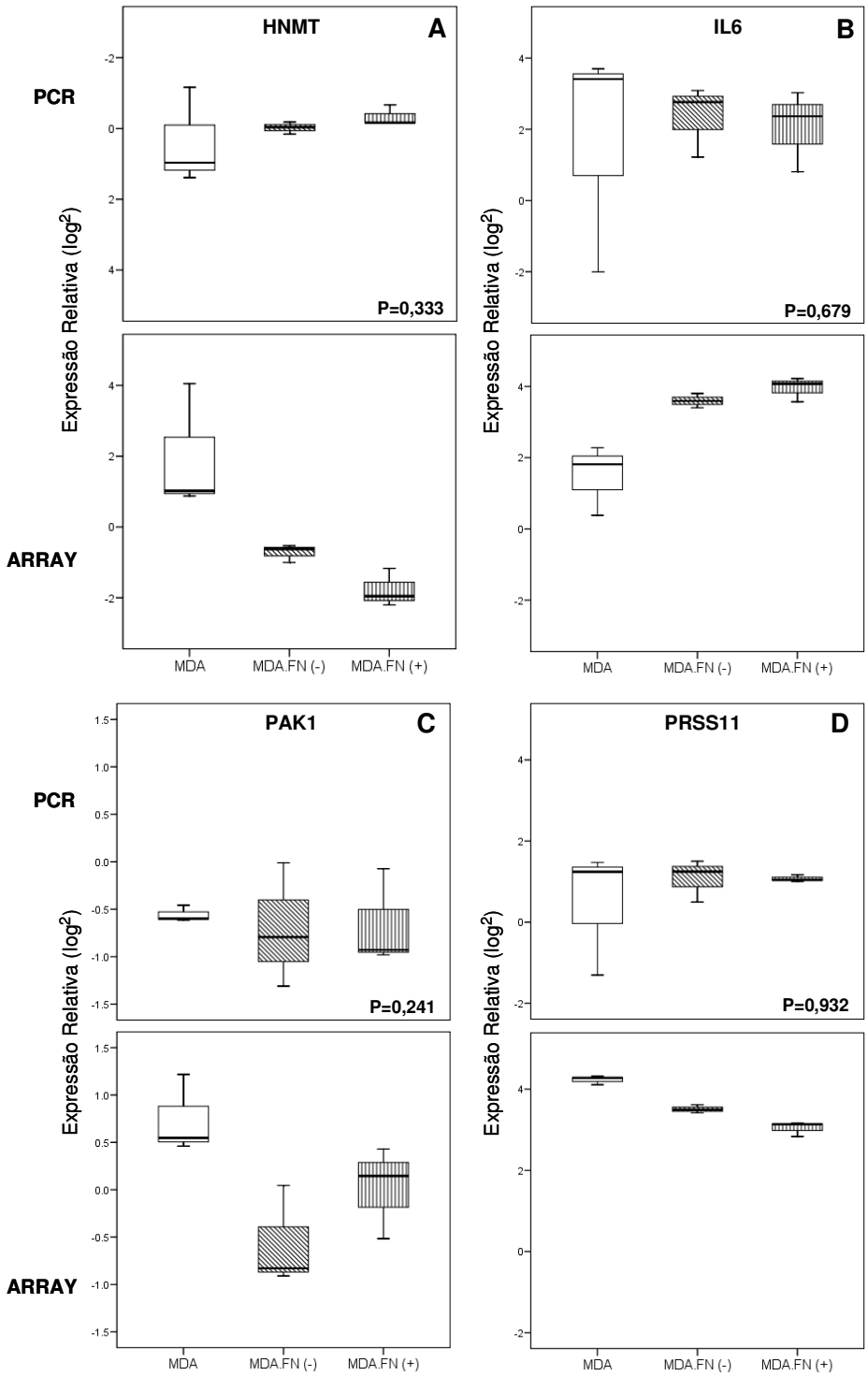


Figura 14. Expressão gênica de células MDA-MB231 (MDA) cultivadas isoladamente (monocultura) ou co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo não comprometido (MDA.FN (-)/ MDA) (n=5) e comprometido (MDA.FN (+)/ MDA) (n=5). A expressão dos genes HNMT, IL6, PAK1 e PRSS11 foi verificada por *cDNA microarray* e RT-PCR. O boxplot representa o valor de expressão relativa transformado em log2. Todos os valores estão contidos entre as barras (valores 25%, 50% e 75% dentro da caixa). Teste de *Kruskal-Wallis* (p dentro da figura) e se p≤0,05 utilizou-se o teste de *Mann-Whitney* para verificar a significância entre os grupos.

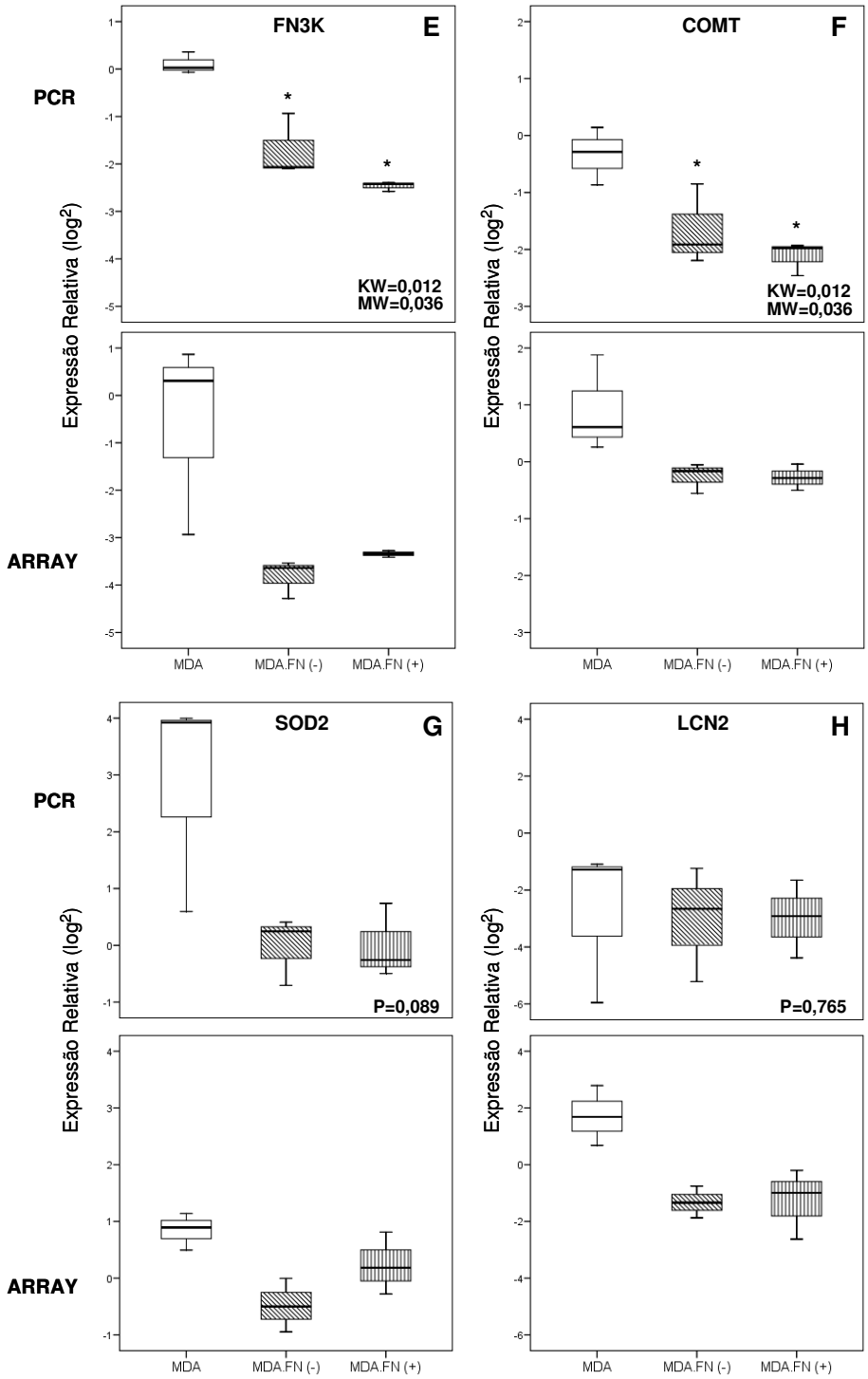


Figura 15. Expressão gênica de células MDA-MB231 (MDA) cultivadas isoladamente (monocultura) ou co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo não comprometido (MDA.FN (-)/ MDA) (n=5) e comprometido (MDA.FN (+)/ MDA) (n=5). A expressão dos genes FN3K, COMT, SOD2 e LCN2 foi verificada por *cDNA microarray* e RT-PCR. O boxplot representa o valor de expressão relativa transformado em log2. Todos os valores estão contidos entre as barras (valores 25%, 50% e 75% dentro da caixa). Teste de *Kruskal-Wallis* (p dentro da figura) e se p≤0,05 utilizou-se o teste de *Mann-Whitney* para verificar a significância entre os grupos.

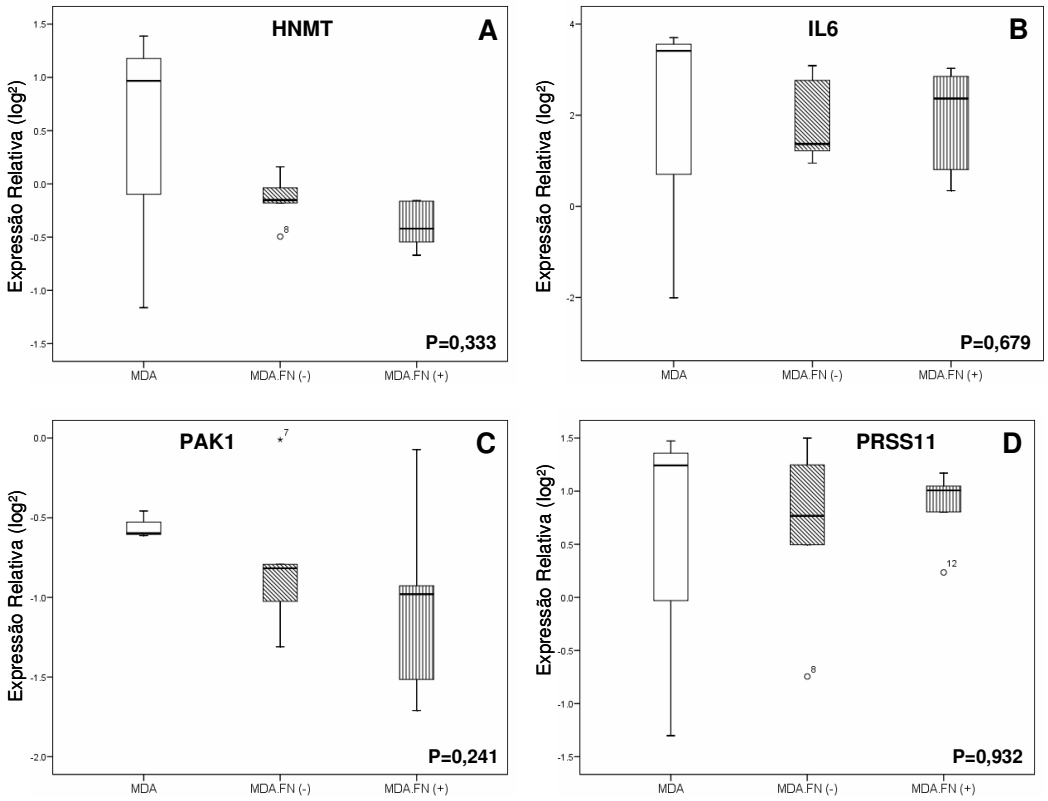


Figura 16. Expressão gênica de células MDA-MB231 (MDA) cultivadas isoladamente (monocultura) ou co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo não comprometido (MDA.FN (-)/ MDA) (n=5) e comprometido (MDA.FN (+)/ MDA) (n=5). A expressão dos genes HNMT, IL6, PAK1 e PRSS11 foi verificada por RT-PCR. O boxplot representa o valor de expressão relativa transformado em log2. Todos os valores estão contidos entre as barras (valores 25%, 50% e 75% dentro da caixa). Teste de *Kruskal-Wallis* (p dentro da figura) e se p≤0,05 utilizou-se o teste de *Mann-Whitney* para verificar a significância entre os grupos.

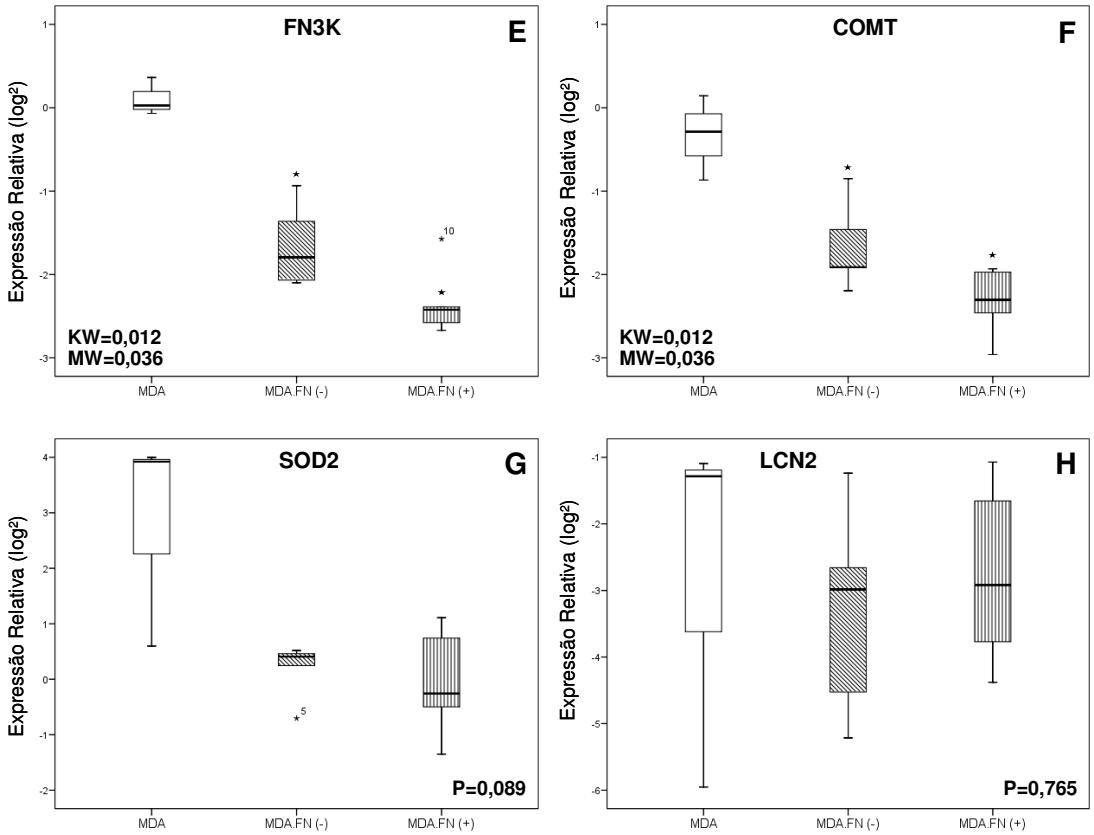


Figura 17. Expressão gênica de células MDA-MB231 (MDA) cultivadas isoladamente (monocultura) ou co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo não comprometido (MDA.FN (-)/ MDA) (n=5) e comprometido (MDA.FN (+)/ MDA) (n=5). A expressão dos genes FN3K, COMT, SOD2 e LCN2 foi verificada por RT-PCR. O boxplot representa o valor de expressão relativa transformado em log2. Todos os valores estão contidos entre as barras (valores 25%, 50% e 75% dentro da caixa). Teste de *Kruskal-Wallis* (p dentro da figura) e se p≤0,05 utilizou-se o teste de *Mann-Whitney* para verificar a significância entre os grupos.

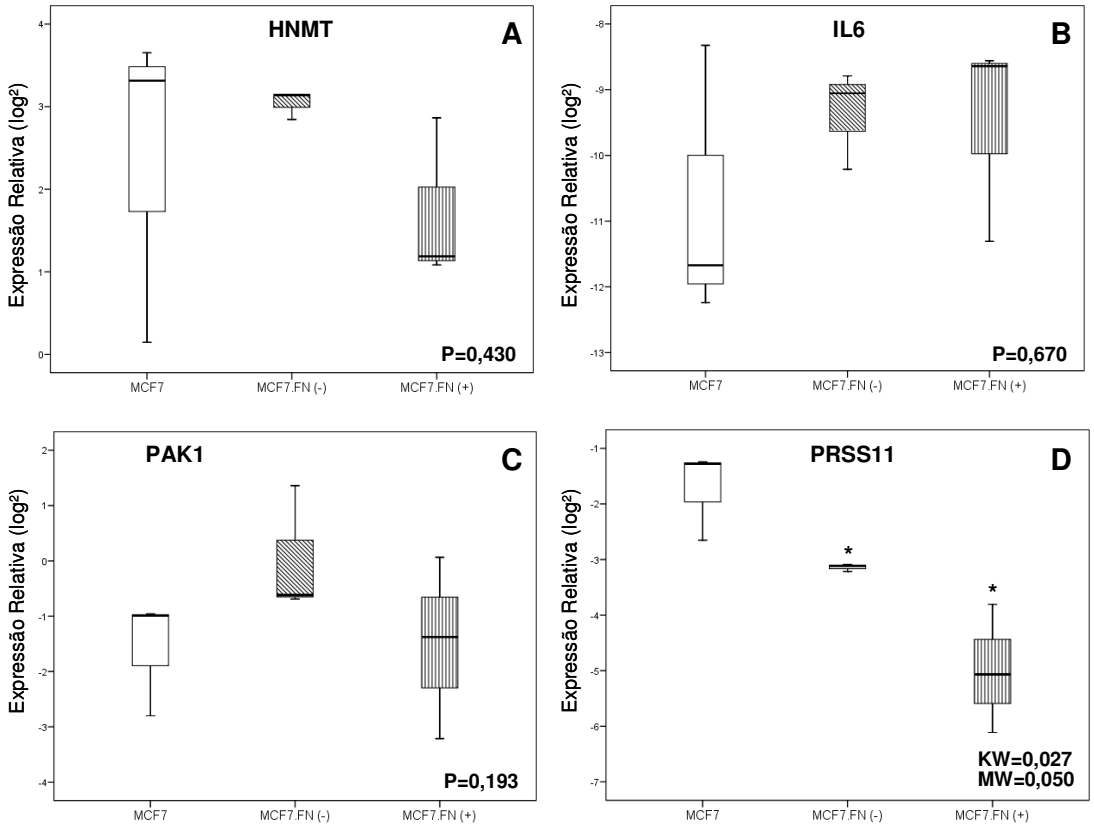


Figura 18. Expressão gênica de células MCF-7 cultivadas isoladamente (monocultura) ou co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo não comprometido (MCF7.FN (-)/ MCF7) (n=3) e comprometido (MCF7.FN (+)/ MCF7) (n=3). A expressão dos genes HNMT, IL6, PAK1 e PRSS11 foi verificada por RT-PCR. O boxplot representa o valor de expressão relativa transformado em log2. Todos os valores estão contidos entre as barras (valores 25%, 50% e 75% dentro da caixa). Teste de *Kruskal-Wallis* (p dentro da figura) e se p≤0,05 utilizou-se o teste de *Mann-Whitney* para verificar a significância entre os grupos.

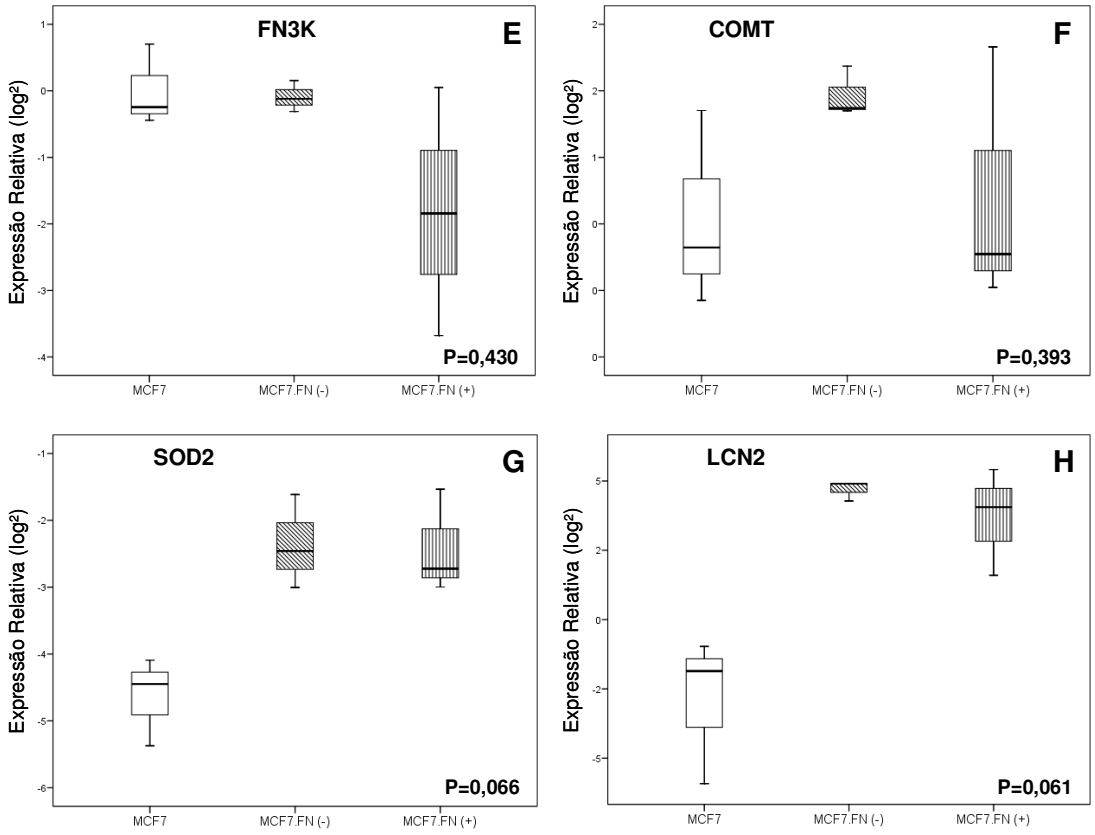


Figura 19. Expressão gênica de células MCF-7 cultivadas isoladamente (monocultura) ou co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo não comprometido (MCF7.FN (-)/ MCF7) (n=3) e comprometido (MCF7.FN (+)/ MCF7) (n=3). A expressão dos genes FN3K, COMT, SOD2 e LCN2 foi verificada por RT-PCR. O boxplot representa o valor de expressão relativa transformado em log2. Todos os valores estão contidos entre as barras (valores 25%, 50% e 75% dentro da caixa). Teste de *Kruskal-Wallis* (p dentro da figura) e se p≤0,05 utilizou-se o teste de *Mann-Whitney* para verificar a significância entre os grupos.

5.DISCUSSÃO

Nosso estudo dá força à hipótese de que os fibroblastos estromais contidos nos linfonodos influenciam o comportamento das células epiteliais malignas, pois observamos que estes regulam a expressão de vários genes de células MDA-MB231, conferindo a estas um perfil gênico que agrupa distintamente células cultivadas isoladamente e células mantidas na presença dos fibroblastos.

A co-cultura de fibroblastos de linfonodos não comprometidos com células MDA-MB231 mimetiza um primeiro contato entre os fibroblastos do linfonodo, o qual pelo exame histopatológico encontrava-se livre de doença. O microambiente pode influenciar a evolução regional da metástase de dois modos. No primeiro caso a célula tumoral isolada permanecerá quiescente e não comprometerá o prognóstico da doença. No caso sombrio, haverá desenvolvimento regional do tumor.

Nossos dados indicam que a regulação de transcrição é uma das funções moduladas em células cancerosas que migram para o linfonodo, e vários genes envolvidos neste processo foram hipoexpressos como, LITAF (*Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor*), fator ativado por lipopolissacáride, que por sua vez ativa a transcrição de fator de necrose tumoral (TNF) (Polyak *et al.*, 1997); TEF (*Thyrotroph embryonic factor*), fator de transcrição que promove a transcrição de hormônio estimulador de tireóide (TSH) (Drolet *et al.*, 1991); SMARCD3 (*SWI/SN related matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily D, member 3*), que codifica um componente do complexo de remodelação da cromatina, processo que precede a ativação de alguns genes (Wang *et al.*, 1996); CITED2 (*CBP/p300-*

Interacting transactivador, with GLU/ASP-Rich C-Terminal Domain, 2; CITED2) ou MRG1, que codifica uma proteína nuclear que associada a um domínio de ligação ao DNA pode ativar a transcrição de certos genes. Uma isoforma alternativa de CITED2 contendo a Junção 35SRJ, é induzida por hipóxia, competindo com o fator H1F1 para ligar-se a p300-CH1, inibindo portanto a transativação mediada por H1F1 (Bhattacharya *et al.*, 1999).

Outras funções reguladas foram ciclo celular e regulação na progressão do ciclo celular, e dentre os genes envolvidos nestas funções e que foram mais expressos em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodos não comprometidos encontram-se: E2F3, TFDP1, RBBP6, CUL3, UB2V2 e CTCF e dentre os menos expressos, RIF1, SUFU, STIM1, PARD6A e PSMD8.

E2F3 (*E2F transcription factor 3*) e TFDP1 (*Transcription factor DP1)* podem formar heterodímeros que ativam a transcrição de vários genes que induzem a progressão pelo ciclo celular, incluindo proteína do retinoblastoma RB1 e proteínas relacionadas à RB. RBBP6 (*retinoblastoma-binding protein 6*) também conhecida como P53 associada à proteína celular, derivada testis ou PACT, pode modular a via de RB1 ou P53. RBBP6 pode se ligar a RB hipo-fosforilada ou aumentar a afinidade entre MDM2 e P53, causando ubiquitinação e degradação de P53, que culminam com estímulo da proliferação e inibição de apoptose. Além disso, STIM1 (*Stromal interaction molecule 1; STIM1*), conhecido também como GOK, age como supressor de tumor, e teve sua expressão inibida (Sabbbioni *et al.*, 1997). De acordo com nossos resultados, Lee *et al.* (2003) demonstraram que células MDA-MB435,

oriundas de metástase linfonodal estabelecida em modelo xenogênico, apresentam aumento da taxa de proliferação quando comparadas com células parentais mantidas em cultura, indicando que o microambiente pode influenciar a proliferação.

Por outro lado, CTCF (*CCCTC-binding factor*) que participa do processo de regulação de vários genes envolvidos no ciclo celular e causa inibição da proliferação, também teve sua expressão induzida em células MDA-MB231 em co-cultura. Deleções no cromossomo 16q22.1 e perda de heterozigose foram encontrados em tumores de mama e próstata, reforçando a hipótese de que trata-se de um gene supressor de tumores (Recillas-Targa *et al.*, 2006).

Vários genes envolvidos no processo de ubiquitinação também tiveram sua expressão induzida em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodos não comprometidos, como CUL3 (*Cullin3*), que codifica um componente da ubiquitina ligase E3, essencial para a divisão mitótica (Sumara *et al.*, 2007); ou inibida, como PSMD8 (*Uchl5-interacting protein; UCHL5IP ou UCH37-interacting protein 1;Uip1)*, que codifica uma enzima que reverte a ubiquitinação,

Encontramos 78 genes regulados exclusivamente em células MDA-MB231 expostas a fibroblastos de linfonodos não comprometidos (e não de fibroblastos de linfonodo comprometido). Um dos genes menos expressos em células MDA-MB231 (mas não em células MCF7) em co-cultura com fibroblastos de linfonodo não comprometido foi SOD2.

SOD2 *(Superoxide dismutase 2)* codifica uma enzima intramitocondrial envolvida na inativação de produtos superóxidos produzidos pela fosforilação oxidativa, as quais participam da gênese de vários processos degenerativos (Li *et al.*,1995). De acordo com nossos dados, Montel *et al.* (2006), num modelo xenogênico de câncer de mama observaram menor expressão de SOD2 em amostras tumorais de metástase linfonodal em relação à linhagem parental de câncer de mama, sugerindo que o microambiente modula negativamente a expressão deste gene, contribuindo para um acúmulo de danos oxidativos ao DNA.

Em células MDA-MB231, a presença de fibroblastos de linfonodos comprometidos modulou a expressão de 188 genes, representando cerca de 3,98% dos genes imobilizados na lâmina de *cDNA microarray*. Este número de genes regulados está além daquele descrito por dois outros grupos. Feng *et al.* (2007), identificaram 79 genes diferencialmente expressos, entre tumor primário e metástase linfonodal, em amostras pareadas de 26 pacientes com câncer de mama, representando 0,37% do universo pesquisado. Montel *et al.* (2006) encontraram 27 genes regulados em amostra de metástase linfonodal de modelo xenogênico em relação à linhagem parental, isto é 0,08% dos genes avaliados. Podemos aventar a hipótese de que o modelo de co-cultura analisa mais especificamente a influência exercida por fatores solúveis secretados por fibroblastos estromais, enquanto o microambiente linfonodal *in vivo*, agrega outros agentes modificadores da resposta gênica.

Nossos estudos anteriores mostraram que o perfil gênico de fibroblastos estromais obtidos de linfonodos comprometidos e não

comprometidos é bastante similar (Santos, 2006), entretanto, a presença de células MDA-MB231 influencia a expressão de vários genes. Esta interação parece recíproca, pois mostramos agora que a presença de fibroblastos altera a expressão de inúmeros genes em células de câncer de mama.

Em células MDA-MB231 na presença de fibroblastos de linfonodo comprometidos, vários genes estavam envolvidos na função do ciclo da ubiquitina, tiveram sua expressão induzida como HECTD1 (*HECT domain containing 1*), que possui um domínio catalítico de uma subclasse da ubiquitina-proteína ligase (E3), que transfere a ubiquitina e promove sua degradação; NEDD4L *(ubiquitin protein ligase NEDD4-like);* UBE1C (*Ubiquitin-activating enzyme E1C*); UBE2V2 *(Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2*); FBXL14 (*F-box and leucine-rich repeat protein 14*) membro da família F-box, atuando como ligante de proteína-ubiquitina (Jin *et al.*, 2004), e RBBP6 (*Retinoblastoma-binding protein 6*),que aumenta a degradação de p53, como já exposto. Outros três genes foram menos expressos, USP20 (*ubiquitin specific peptidase 20*); FBXW1b (*F-box and WD40 domain protein 11; FBXW11*) e VCP (*Valosin-containing protein*). As proteínas F-box, como a FBXW11 são componentes de proteínas ligantes de ubiquitina E3 chamadas SCFs, e VCP é uma proteína estrutural que forma complexos como a Clatrina, que está envolvida em uma série de eventos celulares que são regulados durante a mitose, como fusão de membrana e degradação protéica ubiquitina-dependente (Kobayashi *et al.*, 2007).

Apesar da função de *splicing de mRNA* nuclear, via spliceossoma, ter sido induzida em MDA-MB231 co-cultivada com fibroblastos de linfonodo

comprometido e não comprometido, esta ocorreu principalmente na presença de fibroblastos de linfonodo comprometido, pois vários genes foram mais expressos como SF3B4 (*Splicing factor 3b, subunit 4*), LSM3 (*Sm-like proteins*), HNRPH3 (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3*), TARDBP (*Tar DNA-binding protein*), SFRS6 (*Splicing factor arginine/serine-rich,6*), SFRS3 (*Splicing factor arginine/serine-rich,3*) e SFRS2 (*Splicing factor arginine/serine-rich,2*).

Entre os 188 genes regulados em células MDA-MB231, 111 genes foram modulados exclusivamente por células MDA-MB231 co-cultivados com fibroblastos de linfonodo comprometido, entre eles, HTRA1 (*HTRA serine peptidase 1 ou protease serine 11, PRSS11*) que foi hipoexpresso, codifica uma protease que cliva a proteína ligante 5 de IGF (IGFB5), participando também da via de sinalização do TGFβ e com provável função de gene supressor de tumores (Clawson *et al.*, 2008). HTRA1 foi inicialmente descrito por nós como um gene menos expresso em amostras de câncer de mama resistentes à quimioterapia neoadjuvante (Folgueira *et al.*, 2005). Além disso, de acordo com nossos resultados atuais, HTRA1 foi também hipoexpresso em amostras de câncer de mama metastático para linfonodos em relação ao tumor primário (Feng *et al.*, 2007). Estes dados reforçam a hipótese de que HTRA1 seja um gene supressor de tumor.

Na análise do *cDNA microarray*, observamos que os fibroblastos independentemente de sua origem (fibroblastos de linfonodo comprometido ou não comprometido) modularam a expressão de 77 genes em células MDA-MB231, os quais parecem estar envolvidos em uma resposta inespecífica à

presença dos fibroblastos, entre eles, enzimas envolvidas no metabolismo de esteróides: HMGCS1 (*3-hydroxy-3-methyglutaril-Coenzime A syntetase (soluble*)), envolvida na gênese do colesterol, mais expressa, e COMT (*catechol-O-methyltransferase*), menos expressa. O estrogênio 2 e 4 - hidroxiestradiol (2-OHE_2 e 4-OHE_2) são metabólitos do estrógeno (Bergman-Jungeström , 2001) com capacidade de reagir com o DNA e induzir alterações estruturais em cromossomos, isto é, mutações e consequentemente a iniciação do câncer. COMT cataliza metilação das formas 2 e 4 hidroxiestradiol. No câncer de mama, são encontradas altas concentrações desses metabólitos, as quais são menores em tecidos normais, onde a via ubiquitina catecol-O-metiltransferase encontra-se ativa (Zahid *et al.*, 2007, Lehman *et al.*, 2008).

Outro gene menos expresso em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos de linfonodo comprometido e não comprometido, é FN3K (*fructosamine 3 kinase*), que cataliza a fosforilação de frutosaminas formadas pela glicação, reação não-enzimática da glicose com aminas primárias. Estas proteínas glicadas têm papel na fisiopatologia de várias doenças, como diabetes e a fosforilação das frutosaminas inicia o metabolismo destas proteínas modificadas. Por este motivo, a enzima frutosamina 3 quinase pode ser considerada uma proteína de reparo, dado sustentado pelo fato de que a inibição da FN3K em eritrócitos leva a um aumento da quantidade de hemoglobina gliocosilada (Caruso *et al.*, 2007). Uma menor expressão desse gene sugere que a eficácia do sistema enzimático protetor dessas células mamárias malignas está comprometido na presença dos fibroblastos.

SLC22A18 *(solute carrier family 22*) foi outro gene hipoexpresso em células MDA-MB231 na presença de fibroblastos. Este gene está contido na região cromossômica 11p55.5 onde alterações estão associadas à gênese de várias tumores como carcinomas de pulmões, ovários, mama, tumor de Wilms e rabdomiossarcomas (Gallagher *et al.*, 2008). A perda de heterozigose nessa região sugere atuação desse gene como supressor de tumores.

Alguns genes candidatos não tiveram sua expressão diferencial comprovada pelo ensaio de RT-PCR, como IL6, PAK1, HNNMT e LNC2.

IL6 (*interleukin 6*) é uma citocina multifuncional com função reguladora da resposta imune, inflamatória e produção de componentes da matriz extracelular (Basolo *et al.*, 1996), envolvida em vários processos como regulação da proliferação celular, sobrevivência, metabolismo, angiogênese (Schafer, *et al.*, 2007). PAK1(*p21/CDC42/RAC1*) é um membro da família das serina/treonina quinase, alvo de proteínas GTP ligantes como Cdc42 e Rac, com participação em variedade de funções como morfogênese, motilidade e sobrevivência celular, angiogênese e mitose (Wang *et al.*, 2006). HNMT (*histamine N-methyltransferase*) codifica a primeira enzima que é encontrada no citosol que cataliza a N-metilação da histamina. Foram encontradas múltiplas variantes deste gene. Níveis alterados de atividade da enzima histamina n-metiltransferase estão associados com polimorfismos genéticos para HNMT, sugerindo que variação individual encontrada no metabolismo de histamina pode desempenhar um papel importante em várias doenças como asma, alergias, úlcera péptica e os distúrbios neuropsiquiátricos (Preuss *et*

al., 1998). LCN2 (*lipocalin 2*) também conhecida como NGAL é um membro da superfamília de proteínas carreadoras expressa em precursores granulocíticos e numerosos tipos celulares (Hanai *et al.*, 2005). A expressão desse gene já foi detectado em diversos tecidos humanos de adultos como medula óssea, útero, próstata, glândula salivar, estômago, cólon, traquéia e pulmões. Estudos sugerem que LCN2 induz apoptose em células hematopoiéticas (Miharada *et al.*, 2007). Em células de câncer de mama de camundongo 4T1, que metastatizam para ossos, fígado, pulmões e mama, observou-se que a introdução da lipocalina 2 reduz o crescimento tumoral (Hanai *et al.*, 2005).

Logo, em duas linhagens de câncer de mama, MDA-MB231 e MCF-7, determinamos que fibroblastos estromais obtidos de linfonodos regulam sua expressão gênica, mas não observamos similaridades nos resultados obtidos. De acordo com Montel *et al.* (2006), demonstraram em duas diferentes sublinhagens de células MDA-MB435, a expressão gênica pode ser influenciada de modo diferencial pelo microambiente do tumor primário e da metástase.

A interação entre as células é dinâmica e é possível que células com graus variáveis de agressividade sejam influenciadas de modo diferencial pelo microambiente, pois MDA-MB231 é uma célula “triplo negativo”, ou seja, não expressa receptores para ER, PR e ErbB2, e possui alto potencial metastático e a MCF-7 é uma célula que expressa receptores hormonais para estrógeno e progesterona, não expressa ErbB2 e tem baixo potencial de invasividade. É possível que a célula maligna seja portadora de alterações

genômicas específicas que determinam em parte o prognóstico da doença, o qual pode também ser influenciado por um microambiente permissivo ou restritivo para o desenvolvimento do tumor.

As diferenças de expressão gênica encontradas nos ensaios de *cDNA microarray* e RT-PCR em amostras de fibroblastos de linfonodos, não devem ter sido causadas pelo meio de cultura, pois foram utilizados o mesmo tipo de meio de cultura para todos os ensaios. No entanto, o lote de soro não foi o mesmo para os ensaios de co-cultura utilizados posteriormente para análise por *cDNA microarray* e RT-PCR. Estas diferenças também não devem ser resultantes de diferentes passagens celulares em cultura, pois os fibroblastos utilizados nestes ensaios encontravam-se ainda em passagens precoces de cultivo, da terceira à décima quinta passagens.

A técnica de *cDNA microarray* permite avaliar a expressão gênica global e rastrear o perfil gênico de amostras, na entanto esta tecnologia apresenta limitações como pequena acurácia na detecção da expressão gênica diferencial em baixos níveis de expressão e na baixa sensibilidade para detectar pequenas alterações de expressão (Wang *et al.*, 2006).

Entre os fatores que contribuem para uma baixa correlação entre expressão gênica avaliada pelas técnicas de RT-PCR e *cDNA microarray* é o uso de diferentes sondas que identificam partes distintas do gene, podendo resultar na quantificação de diferentes transcritos, como por exemplo, produtos de *splicing* alternativo, pseudogene ou degradação. Em nosso estudo foram selecionados *primers* que codificam seqüências separadas por grandes íntrons, para minimizar a possibilidade de amplificação do DNA

genômico, entretanto, a *seqüência* não apresenta correspondência exata com aquela presente na plataforma de *cDNA microarrray*.

Além disso, trabalhos utilizando as mesmas amostras em ensaios de *cDNA microarrays* e RT-PCR têm mostrado correlações variadas entre as técnicas. Ensaios empregando duas diferentes plataformas de *cDNA microarray* e também RT-PCR, utilizando alíquotas das mesmas amostras de tecido cerebral, pulmonar e hepático mostrou correlação de 34 - 40% entre os ensaios e uma anti-correlações de 6,3 - 9,6% dos genes analisados (Wang *et al.*, 2006). Nosso grupo avaliou o perfil de expressão gênica em cânceres de mama, utilizando também duas plataformas de *cDNA microarray*s diferentes e ao determinar por RT-PCR a expressão de alguns genes selecionados observaram correlação significativamente positiva de 50-62,5% entre os ensaios (Folgueira *et al.*, 2005) Em amostras de leucemias e de tumor cerebral, a correlação entre os ensaios de *cDNA microarray* e PCR na determinação da expressão gênica foi de 67-69% dos genes alvo (Dallas *et al.*, 2005). Em outro estudo onde se avaliou a expressão gênica de fibroblastos oriundo de câncer de mama e tecido benigno de mama, por *cDNA microarray* foram encontrados 135 genes hiperregulados e 38 hiporegulados em fibroblastos de câncer de mama. A expressão de quatro genes foram analisados por RT-PCR nas mesmas amostras mostrando 50% de correlação entre os resultados da expressão gênica em ambas as análise (Singer *et al.*, 2007).

Estudos de validações biológicas da expressão gênica diferencial identificada nos ensaios de *cDNA microarray* e utilizando um outro grupo de

amostras para análise em ensaios de RT-PCR, como realizado neste trabalho, tem concordância variada. Chiu *et al.* (2005) selecionaram genes encontrados hiperexpressos em amostras de câncer colorretal em relação à mucosa normal correspondente, em ensaios de *cDNA microarray* e a análise de um novo grupo de amostras por ensaios de RT-PCR mostrou 40% de concordância na expressão diferencial destes genes. Liew *et al.* (2006), utilizando células BHK-21 infectadas por vírus da dengue demonstrou 53% de concordância em seus resultados de expressão gênica avaliada pelas duas técnicas, sendo que 27% dos genes apresentaram variação contrária em determinações por *cDNA microarray* versus RT-PCR. Folgueira *et al.*, (2006) comparou diferentes grupos de amostras de pacientes com câncer de mama EC III em relação a tecido mamário normal, tendo concordância da expressão diferencial de quatro de seis genes analisados por *cDNA microarray* e RT-PCR. Perreard *et al.* (2006) selecionaram 53 genes previamente selecionados para obter uma ótima separação dos tumores de mama de acordo com subtipos intrínsecos, observou que amostras pareadas analisadas por *cDNA microarray*s ou RT-PCR foram agrupadas no mesmo subtipo em 98% das vezes. Portanto nossos dados são semelhantes aos vários trabalhos citados, pois representam um misto de validação técnica e validação biológica.

Em suma, observamos que células MDA-MB231 têm seu perfil de expressão modulado diferencialmente pela presença de fibroblastos de linfonodo não comprometido e comprometido. Genes diferencialmente expressos estão envolvidos em *Splicing de RNAm*, via spliceossoma, ciclo celular e regulação da transcrição por promotores da RNA polimerase II. A

expressão de COMT e FN3K foi menor em células MDA-MB231 em co-cultura com fibroblastos e a expressão gênica de HTRA1 foi menor em células MCF-7. Estas diferenças podem ser atribuídas às particularidades de cada linhagem.

6. CONCLUSÕES

1. Fibroblastos originários de linfonodo não comprometido e comprometido influenciam o perfil de expressão gênica de células MDA-MB231, permitindo o agrupamento distinto de células mantidas em co-cultura das células mantidas isoladamente.

2. a) COMT e FN3K foram genes menos expressos em células MDA-MB231 na presença de fibroblastos de linfonodo não comprometido e comprometido.
b) HTRA1 foi menos expresso em células MCF-7 na presença de fibroblastos de linfonodo não comprometido e comprometido.

7. REFERÊNCIAS

Basolo F, Fiore L, Fontanini G, Conaldi PG, Calvo S, Falcone V, Toniolo A. Expression of response to interleukin 6 (IL6) in human mammary tumors. Cancer Res.1996; 56:3118-3122.

Benvenuti, T.T. Influência de células epiteliais mamárias malignas na expressão gênica de células estromais originárias de linfonodo axilar comprometido e não comprometido de pacientes com câncer de mama [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008.

Bergamaschi A, Tagliabue E, Sørlie T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R, Russnes HG, Nesland JM, Tammi R, Auvinen P, Kosma VM, Ménard S, Børresen-Dale AL. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. J Pathol. 2008; 214(3):357-367.

Bergman-Jungeström M, Wingren S. Catechol-O-Methyltransferase (COMT) gene polymorphism and breast cancer risk in young women. Br J Cancer. 2001; 85(6):859-862.

Bhattacharya S, Michels, C L, Leung MK, Arany ZP, Kung A L, Livingston DM. Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. Genes Dev. 1999; 13:64-75.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer iniciation and progression. Nature.2004; 432:332-337.

Bissel MJ, Hadisky D. Putting tumours in context. Nature Review Câncer. 2006; 1: 46-54.

Bissell MJ, Weaver VM, Lelièvre SA, Wang F, Petersen OW, Schmeichel KL.Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. Cancer Res. 1999; 59:1757-1763.

Camps JL, Chang SM, Hsu TC, Freeman MR, Hong SJ, Zhau HE, Von Eschenbach AC, Chung LWK. Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.1990; 87:75-79.

Caruso MG, Notarnicola M, Altomare DF. Gene expression of fructosamine 3 kinase in patients with colorectal cancer. Oncology. 2007; 73: 72-75.

Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW, Chen CL, Shu HF, Li H. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using *cDNA microarray* and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005; 14(2):437-443.

Clawson GA, Bui V, Xin P, Wang N, Pan W. Intracellular localization of the tumor suppressor HtrA1/ Prss11 and its association with HPV16 E6 and E7 proteins. J Cellular Biochem. 2008; 105:81-88.

Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ, Beesley AH, Hoffmann K, Terry PA, Freitas JR, Boag JM, Cummings AJ, Kees UR.Free in PMCGene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate?. BMC Genomics. 2005; 6:59

De Cremoux P, Bieche I, Tran-Perennou C, Vignaud S, Boudou E, Asselain B, Lidereau R, Magdelénat H, Becette V, Sigal-Zafrani B, Spyratos F. Inter-laboratory quality control for hormone-dependent gene expression in human breast tumors using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Endocr Relat Cancer. 2004; 3:489-495.

Dong-Le Bourhis X, Berthois Y, Millot G, Degeorges A, Sylvi M, Martin PM, Calvo F. Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumorous breast tissue on the proliferation of human breast cancer cell lines in co-culture. Int J Cancer. 1997; 71:42-48.

Drolet DW, Scully KM., Simmons DM, Wegner M, Chu K, Swanson LW, Rosenfeld MG. TEF, a transcription factor expressed specifically in the anterior pituitary during embryogenesis, defines a new class of leucine zipper proteins. Genes Dev. 1991; 5: 1739-1753.

Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. Experimental Cell Res. 2001; 264:169-184.

Feng Y, Sun B, Li X, Zhang L, Niu Y, Xiao C, Ning L, Fang Z, Wang Y, Zhang L, Cheng L, Zhang J, Hao X. Differentially expressed genes between primary cancer and paired lymph node metastases predict clinical outcome of node-positive breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat. 2007; 103:319-329.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allread C, Clark GM, Ruby SG, O`Malley F, Simpson F, Conolly JML, Hayes DF, Edge, SB, Licther A, Schnitt SJ. Prognostic factors in breast cancer. Arch. Pathol. Lab Med.2000; 124: 966-978 .

Folgueira MAAK, Carraro DM, Brentani H, Patrão DF, Barbosa E, Neto M, Caldeiras J, Katayama ML, Soares F, Oliveira C, Reis L, Kaiano J, Camargo L, Vencio R, Snitcovsky I, Makidissi F, Silva P, Goes J, Brentani M.M. Gene expression profile associated with response to doxorrubicin-based therapy in breast cancer. Clinical Cancer Res. 2005; 11:7434-7443.

Gallagher E, Mc Goldrick A, Chung WY, Mc Cormack O, Harrison M, Kerin M, Dervan PA, Mc Cann A. Gain of imprinting of SLC22A18 sense and antisense transcripts in human breast cancer. Genomics. 2006; 88:12-17.

Hanai J, Mammoto T, Seth P, Mori K, Karumanchi A, Barash J, Sukhatme V. Lipocalin 2 diminishes invasiveness and metastasis of Ras transformed cells. The J Biol. Chem. 2005; 280:13641-13647.

Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Ochiai A. Proliferative activity of intratumoral fibroblasts is closely correlated with lymph node and distant organ metastases of invasive ductal carcinoma of the breast. American J Path.2000; 156:1701-1710.

Helleman J, Jansen MP, Ruigrok-Ritstier K, van Staveren IL, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Sieuwerts AM, Klijn JG, Sleijfer S, Foekens JA, Berns EM. Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response. Clin Cancer Res. 2008; 14:5555-5564.

Hellman S. & Harris JR. in Diseases of the Breast (eds Harris, J. R., Lippman, M. E., Morrow, M. & Osborne, C. K.), 407-423 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000).

Hucz J, Kowalska M, Jarząb M, Wiench M. Gene expression of metalloproteinase 11, claudin 1 and selected adhesion related genes in papillary thyroid cancer. Endokrynol Pol. 2006; 57:18-25.

INCA-Ministério da Saúde, Brasil; 2007. Disponível em http://www.inca.org.br

Janssens N, Janicot M, Perera T, Bakker A. Housekeeping genes as internal standards in cancer research. Mol Diagn. 2004; 8:107-113.

Jin J, Cardozo T, Lovering RC, Elledge S J, Pagano M, Harper JW. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. Genes. Dev. 2004; 18: 2573-2580.

Johansson S, Fuchs A, Okvist A, Karimi M, Harper C, Garrick T, Sheedy D, Hurd Y, Bakalkin G, Ekström TJ. Validation of endogenous controls for quantitative gene expression analysis: application on brain cortices of human chronic alcoholics. Brain Res. 2007; 1132: 20-28.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. Aparelho reprodutor feminino. Oitava edição Rio de Janeiro:Guanabara e Koogan; 1995.

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. Nature Reviews. 2006; 30:1-10.

Kobayashi T, Manno A, Kakizuka A. Involvement of valosin-containing protein (VCP)/p97 in the formation and clearance of abnormal protein aggregates. Genes Cells. 2007; 12:889-901.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. PNAS. 2001; 98:12072-12077.

Kupperwasser C, Chavarria T, Wu Magrane, G, Gray JW, Carey L, Richardson A, Weiberg RA. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101:4966-4971.

Kunz-Schughart LA, Heyder P, Schroeder J, Knuechel R.A heterologous 3-D coculture model of breast tumor cells and fibroblasts to study tumor-associated fibroblast differentiation. Exp Cell Res. 2001; 266:74-86.

Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. Breast Cancer Res Treat. 2004; 83:249-289.

Lakhani SR, Davies S, Jones C, Collins N, Odel C, Stratton MR, O'Hare MJ. Genetic alterations in normal luminal and mioepithelial cells of the breast. J Path. 1999; 189:496-503.

LeBedis C, Chen K, Fallavollita L, Boutros T, Brodt P. Peripheral lymph node stromal cells can promote growth and tumorigenicity of breast carcinoma cells through the release of IGF-I and EGF. Int J Cancer. 2002; 100:2- 8.

Lee H, Lin EC, Liu L, Smith JW.Gene expression profiling of tumor xenografts: *In vivo* analysis of organ-specific metastasis. Int J Cancer. 2003; 107:528-34.

Lefebvre MF,Guillot C, Crepin M, Saez S. Influence of tumor derived fibroblasts and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on growth of breast cancer cell lines. Breast Cancer Res Treat. 1995; 33:189-197.

Lehman L, Jiang L, Wagner J. Soy isoflavonas decrease the catechol-O-metthyltransferase-mediated inactivation of 4-hydroxyestradiol in cultured MCF-7 cells. Carcinogenesis.2008; 29:363-370.

Liew KJ, Chow VT.AbstractMicroarray and real-time RT-PCR analyses of a novel set of differentially expressed human genes in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2. J Virol Methods. 2006; 131(1):47-57

Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ.Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. Nature Genet. 2005; 11: 376-381.

Ling MB, Laenkholm A, Pallisgaard N, Ditzel H. Identification of genes for normalization of real time RT-PCR data in breast carcinomas. BMC Cancer. 2008; 20:1-11.

Margolese RG, Lasry JC. Ambulatory surgery for breast cancer patients. Ann Surg Oncol. 2000; 7(3):181-187.

McNeill RE, Miller N, Kerin M J. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real time quantitative PCR studies of breast cancer. BMC molecular biology. 2007; 27:1-13.

Micke P, Ostman A. Tumor-stroma interaction: cancer associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy?. Lung Cancer. 2004; 45:163- 175.

Micke P, Ostman A. Exploring the tumor environment: cancer-associated fibroblasts as targets in cancer therapy. Expert Opin. Ther.Targets. 2005; 9:1-17.

Miharada K, Hiroyama T, Sudo K, Danjo I, Nagasawa T, Nakamura Y. Lipocalin 2-mediated growth supression is evident in human erythroid and monocyte/macrophage lineage cells. J Cellular Physiology. 2007; 215: 526-537.

Montel V, Mose ES, Tarin D. Tumor-stromal interactions reciprocally modulate gene expression patterns during carcinogenesis and metastasis. Int. J. Cancer.2006; 119:251-263.

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. Cell. 2005; 121(3):335-348.

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. N Engl J Med. 2004; 35:2817-2826.

Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, Campisi J. Stromal-epithelial interactions in aging and câncer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. J Cell Science. 2004; 118:485-496.

Patocs A, Zhang L, Xu Y, Weber F, Caldes T, Mutter GL, Platzer P, Eng C.Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. N Engl J Med. 2007; 357(25):2543-2551.

Perreard L, Fan C, Quackenbush JF, Mullins M, Gauthier NP, Nelson E, Mone M, Hansen H, Buys SS, Rasmussen K, Orrico AR, Dreher D, Walters R, Parker J, Hu Z, He X, Palazzo JP, Olopade OI, Szabo A, Perou CM, Bernard PS.Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay. Breast Cancer Res. 2006; 8(2):R23.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001, 29:2002-2007.Pishvaian MJ, Feltes CM, Thompson P, Bussemakers MJ, Schalken JA, Byers SW. Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. Cancer Res. 1999; 59:947-52.

Pishvaian MJ, Feltes CM, Thompson P, Bussemakers MJ, Schalken JA, Byers SW.Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. Cancer Res. 1999; 59(4):947-952.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. Nature.1997; 389:300-305.

Preuss CV, Wood TC, Szumlanski CL, Raftogianis RB, Otterness DM, Girard B, Scott MC, Weinshilboum RM.Human histamine N-methyltransferase

pharmacogenetics: common genetic polymorphisms that alter activity. Mol Pharmacol. 1998; 53(4):708-717.

Recillas-Targa F, Rosa-Velasquez IA, Soto-Reyes E, Benitez-Bribiesca.Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. J. Cell. Mol. Med. Vol 10, No 3, 2006 pp. 554-568

Rich, B. E.; Steitz, J. A. : Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: analysis of cDNA clones, *in vitro* synthesis, and assembly. Molec. Cell. Biol. 1987; *7*: 4065-4074.

Sabbioni S, Barbanti-Brodano G, Croce, CM, Negrini M. GOK: a gene at 11p15involved in Rhabdomyossarcoma and Rhaboid tumor development. Cancer Res. 1997; 57:4493-4497.

Sadlonova A, Novak Z, Johnson MR, Bowe DB, Gault SR, Page GP, Thottassery J V, Welch DR, Frost AR. Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional *in vitro* co-culture. Breast Cancer Res. 2005; 7:46-59.

Santos, R. P. C. Expressão gênica diferencial de fibroblastos de linfonodos comprometidos ou não comprometidos de pacientes com câncer de mama após cultura isolada ou co-cultura com células epiteliais mamárias normais ou malignas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.

Schafer ZT, Brugge JS. IL-6 involviment in epithelial cancers. The Journal of clinical investigation.2007; 117:3660-3663.

Shekhar MPV, Wredell J, Santner SJ, Pauley RJ, Tait L. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. Cancer Res. 2001; 61:1320–1326.

Shipley JM, Klinkenberg M, Wu BM, Bachinsky DR, Grubb JH, Sly, WS. Mutational analysis of a patient with mucopolysaccharidosis type VII, and identification of pseudogenes. *Am. J. Hum. Genet.* 1993; 52: 517-526.

Singer CF, Gschwantler-Kaulich D, Fink-Retter A, Haas C, Hudelist G, Czerwenka K, Kubista E. Diffrential gene expression profile in breast cancer derived stromal fibroblasts. Breast Cancer Res.2008; 110:273-281.

Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL.Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(19):10869-10874.

Sumara I, Quadroni M, Frei C, Olma MH, Sumara G, Ricci R, Peter M. A Cul3-based E3 ligase removes Aurora B from mitotic chromosomes, regulating mitotic progression and completion of cytokinesis in human cells. Dev. Cell. 2007; 12: 887-900.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.Genome Biol. 2002; 18: 3-7.

Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R.A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. N Engl J Med. 2002; 347(25):1999-2009.

Wang W, Xue Y, Zhou S, Kuo A, Cairns BR, Crabtree GR. Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. Genes Dev. 1996; 10: 2117-2130.

Wang RA, Zhang H, Balasenthil S, Medina D, Kumar R. PAK1 hyperactivation is sufficient for mammary gland tumor formation. Oncogene.2006; 25:2931-2936.

Wang TN, Albo D, Tiszynski GP. Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloproteinase-9 production.Surgery. 2002; 132:220 -225.

West RB, Nuyten DS, Subramanian S, Nielsen TO, Corless CL, Rubin BP, Montgomery K, Zhu S, Patel R, Hernandez-Boussard T, Goldblum JR, Brown PO, van de Vijver M, van de Rijn M. Determination of stromal signatures in breast carcinoma.PLoS Biol. 2005; 3(6):e187.

Yashiro M, Ikeda K, Tendo M, Ishikawa T, Hirakawa K. Effect of organ-especific fibroblasts on proliferation and differentiation of breast cancer cells. Breast cancer res. 2005; 90:307-313.

Zahid M, Saeed M, Lu F, Gaikwad N, Rogan EM, Cavalieri E. Inhibition of catechol-o-methyltransferase increases estrogen-DNA adduct formation. Free Radical Biology & Medicine.2007; 1534-1540.

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo: "Influência de células estromais obtidas de tumor primário e linfonodo de pacientes com câncer de mama na expressão gênica de células malignas" e **"Influência de células epiteliais malignas na expressão gênica de células estromais obtidas de tumor primário e linfonodo de pacientes com câncer de mama"**

INFORMAÇÕES A(O) PACIENTE

INTRODUÇÃO :

A senhora está sendo convidada a participar de uma pesquisa clínica. Os médicos deste Hospital estão estudando a biologia e evolução clínica do câncer de mama; e na tentativa de melhor compreender o desenvolvimento da doença e aprimorar métodos de tratamento do mesmo, necessitam fazer uso da pesquisa clínica, instrumento pelo qual questões a respeito da biologia do câncer podem ser respondidas e novas possibilidades de tratamento podem ser encontradas.

Para decidir se aceita ou não participar desta pesquisa, a senhora precisa entender o suficiente sobre os riscos e benefícios para que possa fazer um julgamento consciente. Este processo é chamado de consentimento livre e esclarecido.

Este formulário de consentimento contém informações sobre a pesquisa em estudo e será discutido com o seu médico. Uma vez compreendido o estudo e havendo seu interesse em participar do mesmo, será solicitada a sua assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A senhora receberá uma cópia para seu arquivo. Se a senhora julgar necessário, consulte outros profissionais (médicos ou não) antes de assinar este documento.

OBJETIVO DO ESTUDO:

Não se conhecem os motivos pelos quais o tumor se desenvolve e também pouco se sabe por que em algumas pessoas ele é mais agressivo enquanto em outras ele tem um comportamento indolente e mas uma melhor compreensão sobre estes aspectos pode no futuro auxiliar no desenvolvimento de métodos de prevenção e tratamento da

doença. Sabe-se que o tumor é composto por células malignas misturadas a outras células que são chamadas de células estromais, que em geral dão sustentação aos tecidos. Há evidências de que ocorrem interações entre estas células e que uma influencia o comportamento da outra. Pretendemos recuperar os fibroblastos (células estromais) do tumor ou linfonodo para estudar sua interação com as células malignas do tumor e para isto precisamos de uma amostra do tumor que será retirado durante a cirurgia. Estas células, os fibroblastos, originárias da amostra coletada, serão mantidas em meio de cultura, utilizados nesta pesquisa, e armazenados em banco de tumores para pesquisas posteriores.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO:

Nesta pesquisa, estes fragmentos de tumor serão processados para análise dos genes expressos pelas técnicas denominadas transcrição reversa e reação de polimerase em cadeia (RT-PCR quantitativo). Essa técnica nos permite analisar se os genes estudados têm baixa ou alta expressão. Vamos correlacionar estes dados com o desenvolvimento do tumor no sítio primário (mama) e no linfonodo da axila.

PROVÁVEIS RISCOS / EVENTOS ADVERSOS:

O tratamento, em si, será o de rotina, sem qualquer interferência por parte dos pesquisadores. Se a cirurgia for indicada pelo médico para o tratamento da doença da senhor, será retirado um fragmento de tecido mamário tumoral e de linfonodo (nódulo) da axila, quando esta for realizada. Este procedimento não apresenta nenhum risco adicional além daquele imposto pela própria cirurgia.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA E SEUS RESPONSÁVEIS:

Todas as pacientes serão acompanhadas de forma habitual no hospital. O médico responsável pela coleta do material será o Dr Eduardo Carneiro de Lyra, que pode ser encontrado no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer, situado à Av. Alcântara Machado, 2576, Mooca, telefone: 6099 3999.

PROVÁVEIS BENEFÍCIOS:

Este protocolo de pesquisa provavelmente não implicará em benefícios para o tratamento da doença da senhora. Por outro lado, este estudo permitirá uma melhor compreensão da biologia molecular do tumor, isto é, do comportamento do tumor, que no futuro pode acarretar uma melhor abordagem terapêutica da doença.

CONFIDENCIALIDADE :

Todos os dados obtidos durante o estudo, relacionados à senhora, serão tratados como confidenciais e apenas revelados às autoridades legais. Nenhuma informação envolvendo seu nome será fornecida a qualquer pessoa, à exceção dos médicos participantes no tratamento. Você não será identificado pessoalmente em qualquer relatório baseado neste tratamento. Os dados do seu caso serão computadorizados e anonimamente utilizados em um relatório final sobre os resultados obtidos. Poderão ser controlados de acordo com os regulamentos atualmente em vigência.

PROTEÇÃO DA PACIENTE :

- Comitê de Ética :

Este protocolo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética cuja atividade é verificar se as condições exigidas para sua proteção e o respeito a seus direitos vem sendo cumpridos.

O Comitê forneceu sua aprovação antes de iniciar este tratamento. Em caso de dúvida entrar em contato com a Dr. Ronaldo Lúcio Rangel Costa – Secretário do CEP através do telefone: 6099-3999 ramal 3855.

SEUS DIREITOS:

A Senhora tem toda a liberdade para decidir se quer ou não participar deste tratamento. Poderá recusar e, se aceitar, poderá abandonar o tratamento a qualquer momento sem ter que fornecer qualquer razão que justifique sua decisão. Além do mais, seu médico terá que lhe avisar se novas informações estiverem disponíveis e forem relevantes para o seu desejo em continuar a participar deste tratamento.

Sua recusa ou abandono subseqüente não terá efeito no seu relacionamento com seu médico. Se a senhora desejar, seu médico irá continuar a tratá-la com os melhores meios disponíveis. Seu relacionamento com a equipe médica não será afetado pela sua decisão. Se a senhora tiver quaisquer perguntas sobre este tratamento, por favor, exponha-as ao seu médico.

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DA PACIENTE

"Influência de células estromais obtidas de tumor primário e linfonodo de pacientes com câncer de mama na expressão gênica de células malignas" e **"Influência de células epiteliais malignas na expressão gênica de células estromais obtidas de tumor primário e linfonodo de pacientes com câncer de mama"**

SEÇÃO DO INVESTIGADOR: (a ser preenchido pelo investigador)

Nome do investigador:Dra Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira.
Local :Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo.
Pessoa de contato :Dr Edison Mantovani Barbosa. **Número do telefone**: 6099 3999.
Confirmo que expliquei o estudo clínico detalhadamente à paciente. Forneci uma folha de informações e respondi a todas as perguntas que a paciente tinha em relação ao estudo.
Assinatura..... **Data**.....

SEÇÃO DA PACIENTE: (a ser preenchida pela paciente)
Código da paciente* .....
Nome da paciente.....
Endereço .....
Telefone.....

SEÇÃO DO REPRESENTANTE LEGAL DA PACIENTE:
(quando necessário à autorização através de outra pessoa que não a paciente. A ser preenchida por este representante).
Grau de parentesco com a paciente:.....
Nome do representante legal:.....

Recebi, li e entendi a **Folha de Informação do Paciente** para o tratamento acima. Também recebi uma explicação adequada sobre este estudo clínico, seus propósitos, riscos e sobre meus direitos como paciente e o que será feito por mim. Eu tive a oportunidade de fazer perguntas antes de tomar qualquer decisão. Poderei solicitar ao meu médico informações adicionais a qualquer momento.

Sei que a decisão de tomar parte deste tratamento é só minha e que tenho o direito de mudar de idéia a qualquer momento durante o curso do estudo sem que isto afete meu tratamento futuro. Deverei informar, em seguida, o meu médico.

Também entendi que o acesso às informações relevantes a partir de meus registros poderá ser solicitado como parte do tratamento e que os dados reunidos durante o mesmo poderiam ser verificados pelas Autoridades de Saúde e representantes do patrocinador, de acordo com a atual legislação.

Estou certa de que não serei identificada a partir dos dados extraídos de meus registros e que todos estes serão processados com o máximo de confidencialidade.

Com base nisso, autorizo minha participação neste tratamento.

Assinatura do paciente ou representante legal:.....

Datado pelo paciente ou representante legal: ___/____/_____

Dr. Ronaldo L. Rangel Costa
Oncologia - Cirurgia
CRM 38002

Article title: Stromal fibroblasts from involved and uninvolved lymph nodes and breast cancer cells reciprocally modulate their gene expression pattern

MS ID : 7921052042209583
Authors : Rosangela PC Santos, Ticiana T Benvenuti, Suzana T Honda, Helena P Brentani, Maria Lucia H Katayama, M Mitzi Brentani, Dirce M Carraro, Cesar H Torres, Eduardo C Lyra, Jane HL Kaiano, Patricia B Rozenchan, Marcia B Salzgeber, JoÃ£o CS GÃ³es and Maria Aparecida AK Folgueira
Journal : BMC Cancer

Dear Prof Folgueira

Thank you for submitting a new version of your article.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures.

http://www.biomedcentral.com/imedia/7921052042209583_article.pdf (1509K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

If the PDF does not contain the comments which you uploaded, please upload the cover letter again, click "Continue" at the bottom of the page, and then proceed with the manuscript submission again. If the letter will not upload, please send a copy to editorial@biomedcentral.com.

Regards

The BioMed Central Editorial Team

Tel: +44 (0)20 7631 9921
Facsimile: +44 (0)20 7631 9923
e-mail: editorial@biomedcentral.com
Web: http://www.biomedcentral.com/