Cintia Milani

**Efeito da vitamina D no perfil transcricional de
cultura organotípica de câncer de mama**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de concentração: Oncologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida
Azevedo Koike Folgueira
Co-orientadora: Dra. Maria Lúcia Hirata
Katayama

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Milani, Cintia

Efeito da vitamina D no perfil transcricional de cultura organotípica de câncer de mama / Cintia Milani. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Radiologia.

Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira.

Co-orientadora: Maria Lúcia Hirata Katayama.

Descritores: 1.Análise de sequência com séries de oligonucleotídeos 2.Vitamina D
3.Calcitriol 4.Neoplasias da mama 5.Reação em cadeia da polimerase

USP/FM/SBD-050/10

Dedico o conteúdo desta pesquisa à Ciência-Mãe, que se traduz em esperança àqueles que sofrem de diversas doenças; e principalmente ao câncer, que atua como protagonista de uma doença incurável.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo (LIM-24), tendo a colaboração dos médicos: Dra. Maria do Socorro Maciel do Hospital A.C. Camargo, Dra Ana Paula Santana de Abreu e Dr. Eduardo Lyra do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer para coleta de casos, do Professor Luiz Fernando da Faculdade de Medicina da USP para análise morfométrica envolvendo a atígeno Ki67 e da bióloga Dra Rosimeire Roela da Faculdade de Medicina da USP para hibridização e análise preliminar das lâminas de cDNA microarray.

O apoio financeiro foi concedido em forma de bolsa de doutorado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e em nível experimental pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo processo nº 2007/04799-2. Parte do trabalho foi realizado em Programa de Doutorado no Exterior desenvolvido no GenNYsis Center for Excellence in Cancer Genomics, University at Albany, tendo como mentora a Dra. JoEllen Welsh.

Àos meus pais

Às minhas irmãs

Ào meu noivo

Agradeço a vocês cuja importância

supera os limites de uma

simples descrição.

Agradecimentos

À minha querida orientadora Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira, pela orientação, pelo carinho, por seu exemplo de luta e dedicação e por ter sido peça chave do chamamento que me levou à ciência.

À minha querida mentora estrangeira JoEllen Welsh pela oportunidade, carinho, conhecimento e, principalmente, por acreditar no meu trabalho.

À professora Maria Mitzi Brentani ter apoiado cientificamente e financeiramente a realização da pesquisa de muitos que por aqui passaram, inclusive eu. Exemplo de conhecimento e dedicação que gerou uma marca indelével no LIM24.

Ao novo professor titular Roger Chammas por valorizar o conhecimento e as interações científicas, imprescindíveis para se conduzir uma pesquisa.

À querida Lúcia, Maria Lúcia Hirata Katayama, companheira de todas as horas ...a quem me falta palavras para agradecer....

À Rosimeire Aparecida Roela pelo carinho, por sempre acreditar em mim, por ter sido a minha “pedra fundamental” no mestrado e ainda me auxiliar nas hibridizações no doutorado.

Às companheiras que já se foram do laboratório Ticiane Thomazine Benvenuti, Rosângela Portilho da Costa Santos, Suzana Terumi Honda, Lúcia Valéria Teixeira da Silva e Renata Afonso Sobral pessoas com as quais compartilhei algumas das melhores lembranças que este laboratório vai me deixar.

A querida Patrícia Bortman Rozenchan pelos anos compartilhados e por ter aberto uma oportunidade sem igual, foi uma porta que se abriu no meu coração reafirmando: “Cintia, tudo é possível, acredite!”

Às queridas amigas Ana Paula Santana de Abreu e Maria do Socorro Maciel pela coleta de amostras.

À Simone Vieira da Costa amiga de todas as horas que torna o dia a dia mais agradável.

À Flávia Rotea Mangone, Fátima Pasini, Natália Broberg e pelo companheirismo e ao professor Igor Snitkovsky pelas discussões científicas.

Ao Tiago Goes dos Santos pela ajuda imprescindível nos ensaios de viabilidade, sem dizer pela tranquilidade e paciência. E à Nicolle Queiroz pelo auxílio com o programa ImageJ.

Ao professor Luiz Fernando “Birnes” pelo auxílio com a contagem do índice de proliferação. São pessoas como esta que sedimentam o real propósito da academia.

Aos companheiros de todas as horas Mateus de Camargo Barros Filho, Laura Campos, Adriana Priscila Trapé, Elen Bastos, Carla Pinheiro, Simone Fernandes, Arthur Alvarenga, Paulo Del Valle e Paulo Pineda.

À extensão de nosso grupo Karina Escobar, Bruno Ferencz Cadima, LÍlian Pires Barbeta e Karen Sant'Anna.

Ao pessoal do Laboratório de Adesão Celular do passado (Luciana, Fabiana, Patrícia, ...) e do presente (Andréa, Guilherme, ...) e sempre dispostos a ajudar.

Ao grupo de cultura celular pela companhia agradável e belos momentos de distração.

À Maria José Gonçalves Benevides, Rosilene Arruda e Ivonete Lima pelo carinho, dedicação e auxílio nas questões administrativas e também à Maria Cristina Piñero Grandal pelo cuidado e disposição no tratamento das imagens.

À amiga Elizangela Dias Neto pela atenção e paciência que dedicou de modo a resolver todas as questões burocráticas na Secretaria de pós-graduação.

Ao Jair Cláudio Alves Oliveira e Willame Silva Macêdo por terem sido prestativos em todas as tarefas requisitadas..

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) por ter financiado a minha bolsa de doutorado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento deste projeto.

Àqueles que por um lapso (ou irresponsabilidade) esqueci de agradecer, porque ninguém consegue fazer pesquisa sozinho. São muitos quereres, um bom tanto de ajuda e uma punhadinho de resultados.

Enfim, agradeço ao LIM24 por estes todos estes anos de amadurecimento pessoal e científico que auxiliaram a moldar a pessoa que sou hoje.

.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1	Introdução	1
2	Objetivos	12
2.1	Objetivo Geral	13
2.1	Objetivos Específicos	13
3	Casuística	14
3.1	Pacientes	15
3.1.1	Crítérios de inclusão	15
3.1.2	Crítérios de exclusão	16
4	Métodos	18
4.1	Coleta e transporte das amostras	19
4.2	Processamento das amostras	19
4.2.1	Cultura de secção de tecido mamário e tratamento com vitamina D	21
4.3	Cultura de células epiteliais mamárias humanas	22
4.3.1	Caracterização do modelo de progressão do câncer	23
4.4	Ensaio de incorporação celular de BrDU em secção tecido mamário	24
4.5	Expressão imunocitoquímica de DPP4 e CD14 em modelo de transformação epitelial mamária	26
4.6	Western blotting para análise de CA2, CD14, VDR e CYP24	27
4.7	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	29
4.8	Tecidos	31
4.8.1	Extração do RNA total	31
4.8.2	Tecnologia do cDNA microarray	33
4.8.2.1	Amplificação das amostras de RNA	34
4.8.2.2	Descrição e Leitura dos Chips de cDNA microarray	41
4.8.2.3	Normalização e análise dos chips de cDNA microarray	45
4.9	Reação de Transcriptase reversa (RT) para obtenção de cDNA	46
4.10	Reação em Cadeia da Polimerase-quantitativa (qPCR)	47
4.11	Análise Estatística	51

4	Resultados.....	52
5.1	<i>Câncer de mama se mantém viável em cultura organotípica.....</i>	<i>53</i>
5.2	<i>Câncer de mama expressa VDR e calcitriol induz a expressão de CYP24A1 em cultura organotípica de câncer de mama.....</i>	<i>56</i>
5.3	<i>Genes diferencialmente expressos entre secção de tecido mamário tumoral tratado com vitamina D ou veículo (etanol)</i>	<i>61</i>
5.4	<i>Expressão de genes candidatos em novo grupo de amostras de câncer</i>	<i>70</i>
5.5	<i>Células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 expressam VDR, e calcitriol induz a expressão de CYP24A1</i>	<i>75</i>
5.6	<i>Modulação da expressão de genes candidatos em célula mamária normal e na carcinogênese mamária.....</i>	<i>78</i>
	5.6.1 <i>Indução da expressão de DPP4 por vitamina D durante a carcinogênese</i>	<i>78</i>
	5.6.2 <i>Indução da expressão de CA2 por vitamina D durante a carcinogênese</i>	<i>80</i>
	5.6.3 <i>Indução da expressão de IL33 por vitamina D durante a carcinogênese</i>	<i>81</i>
	5.6.4 <i>Indução da expressão de IL1RL1 por vitamina D durante a carcinogênese</i>	<i>82</i>
	5.6.5 <i>Indução da expressão de BMP6 por vitamina D durante a carcinogênese</i>	<i>83</i>
	5.6.6 <i>Indução da expressão de CD14 por vitamina D durante a carcinogênese</i>	<i>84</i>
	5.6.7 <i>Indução da expressão de SHE por vitamina D durante a carcinogênese</i>	<i>85</i>
5.7	<i>Expressão protéica de VDR, CYP24A1, CA2 e CD14</i>	<i>87</i>
5.8	<i>Caracterização imunocitoquímica das proteínas CD14, DPP4 e VDR na transformação mamária</i>	<i>91</i>
6	Discussão	94
7	Conclusões.....	105
8	Anexos.....	107
9	Referências Bibliográficas	116
10	Apêndice	

Lista de Abreviaturas

aRNA	– ácido ribonucléico amplificado
BrDU	– bromodeoxiuridina
cDNA	– DNA complementar
cRNA	– ácido ribonucléico complementar
DEPC	– dietilpirocarbonato
DO	– densidade ótica
FDR	– <i>False discovery ratio</i>
HME	– célula epitelial mamária humana imortalizada pela transfecção de hTERT
HME ^{LT}	– célula epitelial mamária humana imortalizada pela transfecção do hTERT e do antígeno T grande do retrovírus SV40
HME ^{PR}	– célula epitelial mamária humana imortalizada pela transfecção do hTERT e do antígeno T grande do retrovírus SV40 e ainda super-expressando o oncogene mutante H-Ras
hTERT	– gene da transcriptase reversa da telomerase
Ki 67	– marcador de proliferação celular
mer	– unidade equivalente a pares de bases
mM	– milimolar
nM	– nanomolar
MM	– emparelhamento incompleto (<i>mismatch</i>)
MCF-7	– linhagem celular epitelial mamária humana bem diferenciada derivada de infusão pleural de adenocarcinoma
PM	– emparelhamento completo (<i>perfect match</i>)

PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase
RMA	– <i>Robust Multichip Averaging</i>
RIN	– <i>RNA Integrity Number</i> . O RIN varia de 0 a 10 em ordem crescente de integridade do RNA total
RNA	– ácido ribonucléico
RNA _m	– ácido ribonucléico mensageiro
RPMI	– meio de cultura do Roswell Park Memorial Institute
RT	– enzima Transcriptase Reversa
VD	– vitamina D (neste trabalho tido como sinônimo para calcitriol e 1,25(OH) ₂ D ₃)

Lista de Tabelas

Tabela 01.....	pág 17
Características das amostras de pacientes coletadas.	
Tabela 02.	pág 35
Características das amostras selecionadas para utilização em técnica de <i>cDNA microarray</i> .	
Tabela 03.	pág 44
Porcentagem de transcritos presentes, ausentes e de detecção marginal nas amostras	
Tabela 04.	pág 50
Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores dos transcritos dos genes alvo e tamanho do produto	
Tabela 05.....	pág 54
Índice de proliferação em secção de tecido tumoral cultivado de maneira totalmente imersa ou em membrana porosa (<i>Teste t de Student</i> para amostras independentes).	
Tabela 06.....	pág 108
Genes diferencialmente expressos entre a concentração de 0.5nM de vitamina D e o controle com variação de expressão de 1.5. Distribuição quanto à ontologia gênica (Processo biológico - nível 3).	
Tabela 07.....	pág 111
Genes diferencialmente expressos entre amostras de câncer de mama expostas <i>in vitro</i> a 1,25(OH) ₂ D ₃ . 0.5nM e 100nM. Teste Repeated Measures Anova (p< 0.05) e variação de expressão maior ou igual a 2 entre grupo controle (veículo) e grupos de amostras tratadas com 1,25(OH) ₂ D ₃ . (0.5nM e 100nM).	
Tabela 08.....	pág 70
Correlação entre valores de expressão relativa dos genes avaliados por cDNA microarray e qPCR.	

Tabela 09.....pág 71

Comparação entre os dados clínicos das pacientes dos grupos
de validação técnica e biológica (Teste Exato de Fisher).

Lista de Figuras

Figura 01.....pág 21

Representação esquemática do fatiador de tecido fresco Krumdieck®. (A) localização da lâmina cortante, (B) poço cilíndrico aonde o tecido a ser fatiado é depositado, (C) sentido do fluxo da solução salina tampão entre os dois compartimentos, (D) vaso coletor, (E) base do cilindro que é ajustada conforme a espessura da fatia, (F) válvula de abertura para recolhimento das fatias. Fonte: Parrish et al., (1995).

Figura 02.pág 22

Figura ilustrativa de secção de tecido tumoral mamário. Espessura da fatia 400µm. Para obtenção da concentração de 0,5nM adicionamos 2 µl de vitamina D a 500 nM em 1,98ml de meio de cultura e para a concentração de 100nM adicionamos 2 µl de vitamina D a 100 µM em 1,98ml de meio de cultura. O período de tratamento foi de 24 horas mantidas a 37°C em de 5% de CO₂. Microscopia óptica NIKON Eclipse E600. Aumento 4x.

Figura 03.....pág 31

Curva padrão para proteína solúvel sCD14, construída a partir da absorbância média de cada padrão no comprimento de onda de 490nm. Leitura realizada no leitor *Victor Microplate Reader* (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EUA).

Figura 04.pág 34

Esquema ilustrativo do primeiro e segundo ciclo de amplificação, hibridização e aquisição de imagens. Fonte: *Expression Analysis Technical Manual*.

Figura 05.pág 36

A e B: RNA total das amostras selecionadas para realização de *cDNA microarray*. Eletroferograma gerado pelo *software* do Bioanalyzer (eletroforese em microcanais formados numa matriz de separação) o qual permite a visualização de bandas correspondentes ao RNA ribossomal, 28S e 18S, cuja relação 28S/18S, correspondente a 2:1, é compatível com amostras de boa qualidade. A-amostra controle, B-amostra tratada com 0,5nM vitamina D, C-amostra tratada com 100nM vitamina D

Figura 06.pág 39

Eletroferograma do cRNA amplificado, biotina marcado, obtido após os dois ciclos de amplificação em amostras de secção de tecido tumoral. O eixo y representa a intensidade de fluorescência enquanto o eixo x representa o tempo da corrida em segundos. A-amostra controle (veículo: etanol), B-amostra tratada com 0,5nM vitamina D, C-amostra tratada com 100nM vitamina D.

Figura 07.....pág 40

Eletroferograma do cRNA biotina marcado após processo de fragmentação. O eixo y representa a intensidade de fluorescência enquanto o eixo x representa o tempo da corrida em segundos. A-amostra controle (veículo: etanol), B-amostra tratada com 0,5nM vitamina D, C-amostra tratada com 100nM vitamina D.

Figura 08.pág 42

Representação esquemática do *probe set* constituído por 11 par de *probes*. O chip de cDNA microarray Human Genome U133 Plus 2.0 array contém 54.000 *probe sets*. PM= emparelhamento completo e MM= emparelhamento incompleto.

Figura 09.pág 43

Exemplo de gradeamento correto do *chip cDNA microarray*.

Figura 10.pág 53

Avaliação da proliferação em fatia de tecido tumoral mamário. Após incubação com bromodeoxiuridina (10ug/ml) em placas sem e com inserto (membrana porosa), as fatias foram embebidas em tampão PBS, fixadas (paraformaldeído 4%), seguida de reação imunocitoquímica com anticorpo anti-bromodeoxiuridina (anti-BrDu) como descrito em métodos. A. Incorporação nuclear de bromodeoxiuridina; B. marcação nuclear com DAPI do mesmo campo de A e C combinação das duas imagens. Estas mesmas foram analisadas em microscópio de fluorescência NIKON Eclipse E600 (Japão) e as imagens capturadas e digitalizadas pelo programa Eclipse Net versão 1.16.3. Aumento 20x

Figura 11.pág 55

Fatia de tecido mantém características morfológicas após cultura primária e tratamento com vitamina D. As amostras foram emblocadas em parafina e coradas com HE. À esquerda amostras correspondentes a zero hora e à direita amostras

tumorais após 24 horas de cultivo na presença ou não de tratamento com 100nM de vitamina D. Aumento 20x

Figura 12.....pág 57

Expressão do gene VDR em amostras de câncer de mama tratadas ou não com calcitriol. As três representações (*probe sets*) do transcrito do gene VDR, A, B e C variam de acordo com a poliadenilação e *splicing* alternativos. No eixo y temos representados os valores de intensidade normalizados, enquanto no eixo x estão as amostras controle (6A, 11A, 12A, 13A, 15A), amostras tratadas com 0,5nM de vitamina D (6B, 11B, 12B, 13B, 15B) e amostras tratadas com 100nM de vitamina D (6C, 11C, 12C, 13C, 15C) por 24 horas de cultivo.

Figura 13.....pág 58

Expressão de CYP24A1 em amostras de câncer de mama tratadas ou não com calcitriol. No eixo y temos representados os valores de intensidade normalizados, enquanto no eixo x estão as amostras controle (A), tratadas com 0,5nM de VD (B) e tratadas com 100nM de VD (C). Os círculos coloridos representam as amostras oriundas das pacientes 6 (azul), 11 (verde), 12 (marrom), 13 (vermelho), 15 (laranja).

Figura 14.....pág 58

Indução do gene alvo da ação da vitamina D, CYP24A1, entre amostras tratadas com 0.5nM e 100nM de vitamina D e veículo (etanol) avaliada por técnica de *cDNA microarray*. Análise por *Repeated Measures Anova*; $p > 0.05$ (GeneSpring GX 10).

Figura 15.pág 59

Expressão do gene VDR por qPCR em outro grupo de amostras de câncer de mama tratadas ou não com calcitriol (teste Kruskal-Wallis; $p < 0.05$). Barras representam médias e erro padrão; $n=16$.

Figura 16.pág 60

Expressão média do gene alvo, CYP24A1, por qPCR em outro grupo de amostras de câncer de mama tratadas ou não com calcitriol (teste Kruskal-Wallis; $p < 0.05$). Barras representam médias e erro padrão; $n=16$.

Figura 17.....pág 62

Estimativa da variância da expressão gênica entre os tumores. As cores azul, verde vermelho, cinza e marrom, correspondem,

respectivamente, às amostras 12, 6, 11, 15 e 13. Cada tumor está representado por 3 círculos que correspondem às amostras controle e tratada com 0.5 e 100nM. Quanto mais próximo entre si, menor a variância da expressão gênica.

Figura 18pág 63

Agrupamento hierárquico baseado na distância euclidiana dos tumores segundo a expressão gênica. A expressão diferencial está representada em uma matriz: cada linha representa um único gene e cada coluna uma amostra. A abundância dos transcritos é representada pela cor da célula correspondente na matriz. A barra de cores representa a variação da expressão: verde indica uma menor expressão enquanto vermelho indica uma maior expressão. O dendograma no ápice da figura representa a similaridades no padrão de expressão entre as amostras experimentais.

Figura 19pág 65

Vias contendo os genes diferencialmente expressos em secção de tecido tumoral tratadas com VD. A razão (*ratio*) demonstrada no diagrama fornece uma visualização da porcentagem de genes pertencentes a uma via específica que estão também em dados de nossas amostras. Seu cálculo está baseado no número de moléculas de uma dada via que compreendem o critério de inclusão (*cutoff*) dividido pelo total de moléculas que fazem parte desta dada via, A razão fornece a associação entre um dado gene e a via a que ele pertence. *P-value*, nível de significância.

Figura 20.....pág 67

Agrupamento hierárquico baseado na distância euclidiana da expressão gênica entre os grupos controle, tratamento fisiológico (0.5nM calcitriol) e tratamento farmacológico (100nM calcitriol) das secções de tecido tumoral . A barra de cores representa a variação da expressão: verde indica uma menor expressão enquanto vermelho indica uma maior expressão

Figura 21pág 69

Expressão dos genes candidatos CD14, DPP4, CA2, SHE, IL1RL1 e IL33 em amostras de câncer de mama tratadas ou não com calcitriol. No eixo y temos representados os valores de intensidade normalizados, enquanto no eixo x estão as amostras controle (6A, 11A, 12A, 13A, 15A), amostras tratadas com 0,5nM de vitamina D (6B, 11B, 12B, 13B, 15B) e amostras tratadas com 100nM de vitamina D (6C, 11C, 12C, 13C, 15C) por 24 horas de cultivo.

Figura 22.....pág 73

Expressão dos genes CA2, CD14 e DPP4 (por qPCR) em amostras de câncer de mama tratadas ou não com calcitriol. Teste de *Friedman* (p dentro da figura) e teste de múltiplas comparações de *Dunn* ($p < 0.001$, a x c, g x i; $p < 0.01$, a x b, g x h; $p < 0.05$, d x f). n=16.

Figura 23.....pág 74

Expressão dos genes SHE, BMP6, IL1RL1 e IL33 (por qPCR) em amostras de câncer de mama tratadas ou não com calcitriol. Teste de *Friedman* (p dentro da figura). n=16.

Figura 24.....pág 75

Indução do mRNA do receptor de vitamina D (VDR) em linhagens HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7. N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

Figura 25.pág 77

Indução do gene alvo da ação da vitamina D, CYP24 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 em amostras tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. ** $p < 0.01$ entre o controle x tratamento de 0.5nM; *** $p < 0.001$ entre o controle e o tratamento de 100nM e também entre o tratamento de 0.5nM e 100nM. N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

Figura 26.pág 79

Indução do gene DPP4 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 em amostras tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. Teste de *Kruskal Wallis* (p dentro da figura); Teste de múltiplas comparações de *Dunn* ($p < 0.01$ a x c; b x c; d x f; e x f; g x h; g x i; $p < 0.05$ d x e; h x i). N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

Figura 27.....pág 80

Expressão do gene CA2 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. Teste de *Kruskal Wallis* (p dentro da figura); Teste de múltiplas comparações de *Dunn* ($p < 0.001$ a x c; b x c; d x f, e x f, g x h, g x i). N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

Figura 28.....pág 81

Indução do gene IL33 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 em amostras tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. Teste de *Kruskal Wallis* (p dentro da figura); Teste de múltiplas

comparações de Dunn ($p < 0.01$ a x c, b x c, d x f, e x f, g x h, g x i). N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

Figura 29.pág 82

Expressão do gene IL1RL1 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. Teste de Kruskal Wallis (p dentro da figura); Teste de múltiplas comparações de Dunn ($p < 0.05$ a x b, j x l; $p < 0.01$ a x c, b x c, d x e, d x f, e x f, g x h, g x i, h x i). N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

Figura 30.pág 83

Indução do gene BMP6 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 em amostras tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. Teste de Kruskal Wallis (p dentro da figura); Teste de múltiplas comparações de Dunn ($p < 0.01$ a x b, a x c, b x c, d x f, e x f, g x h, g x i, h x i). N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

Figura 31.pág 84

Expressão do gene CD14 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. Teste de Kruskal Wallis (p dentro da figura); Teste de múltiplas comparações de Dunn ($p < 0.05$ g x h; $p < 0.001$ a x c, b x c, d x f, e x f, g x i, h x i). N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

Figura 32.pág 85

Indução do gene SHE em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. Teste de Kruskal Wallis (p dentro da figura); Teste de múltiplas comparações de Dunn ($p < 0.001$ a x c, b x c, d x f, e x f, g x h, g x i, h x i, j x l, k x l; $p < 0.05$ j x k). N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

Figura 33.pág 87

Expressão protéica de VDR em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo (C) e 100nM de vitamina D (VD) por 48 horas.

Figura 34.pág 87

Expressão da proteína alvo CYP24A1 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo (C) e 100nM de vitamina D (VD) por 48 horas.

Figura 35.....pág 88

Expressão protéica do gene CA2 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo (C) e 100nM de vitamina D (VD) por 48 horas. A coloração de ponceau aponta uma transferência protéica eficiente e uma quantidade equivalente de proteínas em cada linhagem estudada (figura 40 em anexos).

Figura 36.....pág 89

Expressão protéica do gene CD14 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo (C) e 100nM de vitamina D (VD) por 48 horas. A coloração de ponceau apontou para uma transferência protéica eficiente e similar entre as linhagens estudadas (figura 41 em anexos).

Figura 37.....pág 90

Fração de CD14 secretada (sCD14) para o meio de cultura de células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo (c) e 100nM de 1,25(OH)₂D₃ por 24 horas.

Figura 38.....pág 92

Expressão protéica do gene CD14 em células HME, HME^{LT} e HME^{PR} tratadas com veículo e 100nM de vitamina D por 24 horas. Aumento 40x. Imagens visualizadas em microscópio confocal Leica TCS LSI (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

Figura 39.....pág 93

Expressão protéica do gene DPP4 em células HME, HME^{LT} e HME^{PR} tratadas com veículo e 100nM de vitamina D por 24 horas. Aumento 40x. Imagens visualizadas em microscópio confocal Leica TCS LSI (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

Figura 40.....pág 114

Proteína total extraída de linhagens HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D por 48 horas e imobilizada em membrana de nitrocelulose. Membrana de nitrocelulose destinada a marcação com anticorpo anti-CA2.

Figura 41.....pág 114

Proteína total extraída de linhagens HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D por 48 horas e imobilizada em membrana de nitrocelulose. Membrana de nitrocelulose destinada a marcação com anticorpo anti-CD14.

Resumo

Milani C. *Efeito da vitamina D no perfil transcricional de cultura organotípica de câncer de mama* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

1,25(OH)₂D₃ em concentrações elevadas (10-100nM) exerce efeito antiproliferativo e altera o perfil de expressão gênica de linhagens de câncer de mama. Entretanto, o estudo de linhagens não considera as interações epitélio-mesênquima, as quais regulam o desenvolvimento do tumor. Além disso, elevadas concentrações de 1,25(OH)₂D₃ induzem hipercalcemia *in vivo*. Nossa proposta foi avaliar as ações de uma dose relativamente baixa de 1,25(OH)₂D₃, concentração que pode ser alcançada *in vivo* (0,5nM), e uma concentração farmacológica (100nM) em cultura organotípica de câncer de mama, modelo próximo ao fisiológico que simula as condições *in vivo*, no perfil de expressão gênica. Para isto, avaliamos a integridade da via pela indução do gene alvo CYP24A1. Inicialmente foram avaliadas amostras de 5 pacientes. Biópsias de câncer de mama foram seccionadas, cultivadas e tratadas por 24h com 1,25(OH)₂D₃ 0.5nM ou 100nM. A cultura organotípica manteve-se viável com preservação das características teciduais e índice de proliferação. O perfil de expressão gênica foi determinado pela análise do *chip* de *microarray* (U133 Plus 2.0, Affymetrix). Foram regulados 394 genes (*Repeated Measures ANOVA*, $p < 0.05$, variação de expressão $\geq 1,5$) incluindo genes envolvidos em resposta imune e metabolismo celular primário. Foram selecionados 7 genes vitamina D induzidos (cuja variação de expressão foi ≥ 2 e concordância no sentido da regulação). Análises complementares foram realizadas em um segundo grupo de pacientes ($n=16$) cujas amostras foram processadas da mesma maneira por qPCR. Estes genes eram: CD14, IL33, BMP6; DPP4, CA2, SHE e IL1RL1. Observou-se indução da expressão de CA2, DPP4 e CD14 mediante tratamento com 1 α ,25(OH)₂D₃ 100nM e CA2, também pela concentração 0,5nM. Além disso, avaliamos a expressão de genes candidatos num modelo *in vitro* de transformação mamária composto por células HME, HME^{LT}, HME^{LT+Ras} e também a linhagem MCF7, sob as mesmas condições de tratamento (por qPCR, western blotting, microscopia confocal e ELISA). Todos genes candidatos foram regulados positivamente pela vitamina D no modelo de progressão após o tratamento (RT-qPCR). Dentre eles, CD14, IL1RL1 e SHE também foram induzidos em células MCF7. A fração solúvel de CD14 mostrou-se significativamente aumentada, assim como houve indução da proteína CA2 nas linhagens HME and HME^{LT} tratadas com a VD. Concluindo, temos que a via de sinalização da vitamina D é funcional em secção de tecido tumoral cultivadas *ex vivo*, modelo que preserva as interações epitélio-estroma e simula as condições *in vivo*. Dentre os diversos genes modulados pela 1,25(OH)₂D₃, encontram-se CYP24A1, CA2, DPP4 e CD14, os quais podem representar biomarcadores da ação deste hormônio no câncer de mama.

Descritores: Análise de sequência com séries de oligonucleotídeos, Vitamina

D, Calcitriol, Neoplasias da mama, Reação em cadeia da polimerase.

Summary

Milani C. *Vitamin D effect in the transcriptional profile of breast cancer organotypic culture* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

High 1,25(OH)₂D₃ (VD) concentrations (10-100nM) exerts antiproliferative effects and modifies gene expression profile in breast cancer (BC) cell lines. However, studies conducted in cell lines disconsider stromal-epithelium interactions, which are known to regulate breast cancer development. Besides, high VD concentrations may cause hypercalcemia *in vivo*. Our aim was to evaluate the effects of a relatively low (0,5nM) concentrations of 1 α ,25(OH)₂D₃ which can be attained *in vivo*, and pharmacological concentrations (100nM) in an organ culture model, a physiological model which mimics *in vivo* conditions, by means of differential gene expression profile. Vitamin D pathway integrity was evaluated by the expression of the target gene, CYP24A1. Freshly excised human BC tumor samples were sliced and cultivated in complete culture media containing vehicle, 0.5nM or 100nM 1 α ,25(OH)₂D₃ for 24 hours. Organotypic culture remained viable with preserved tissue architecture and proliferation index for at least 24 hours. Affymetrix (*U133 Plus 2.0*) gene expression profiles obtained in five separate tissue samples for each treatment revealed 394 regulated genes (*Repeated Measures ANOVA*, $p < 0.05$, fold induction $\geq 1,5$). Biological functions over-represented included immune response and primary cellular metabolism. Expression of seven candidate genes (CD14, IL33, BMP6; DPP4, CA2, SHE and IL1RL1; fold induction ≥ 2) was further evaluated in a large number of samples ($n=16$) using qPCR. Among them, CA2, DPP4 and CD14 were induced by 1,25(OH)₂D₃ 100nM. CA2 was also induced after 1,25(OH)₂D₃ 0.5nM treatment. Expression of candidate genes was also assessed in a model of mammary epithelial cell transformation HME, HME^{LT}, HME^{LT+Ras} and also MCF7 cells treated with VD by qPCR, western blotting, confocal microscopy and ELISA assays. The seven genes were confirmed up-regulated by VD (RT-qPCR analysis) in the cell transformation model. Among them, CD14, IL1RL1 and SHE were also modulated in MCF7 cells. A significant increase in soluble CD14 and induction of CA2 protein levels was also detected in HME and HME^{LT} VD treated cells. In conclusion, VD signaling pathway is functional in BC slices cultured *ex vivo*, a model which preserves stromal-epithelial interactions and mimics *in vivo* conditions. Several genes regulated by 1 α ,25(OH)₂D₃ were identified in this model and CYP24A1, CA2, DPP4 and CD14 may represent biomarkers of vitamin D action in human breast cancer.

Descriptors: Oligonucleotide Array Sequence Analysis, Vitamin D, Calcitriol,

Breast neoplasms, Polymerase chain reaction.

1. Introdução

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente entre as mulheres no mundo e no Brasil. O Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde estima que em 2010 ocorrerão 49.240 casos novos de câncer de mama em mulheres no Brasil. Estima-se ainda que, no Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 65 casos novos por 100 mil, sem considerar os tumores de pele não melanoma. Por estas razões este constitui um problema de saúde pública (INCA, 2010).

Fatores de risco conhecidos como exposição hormonal, história familiar, idade, constituem-se fatores predisponentes para o câncer de mama, mas não explicam todas as variações de risco individuais. Outras influências como dieta e atividade física provavelmente também desempenham um papel (Pike et al, 1983; Kolonel et al, 2004; Draper, 2006).

Observações epidemiológicas sugerem que latitudes elevadas estão associadas com maior incidência e risco aumentado de mortalidade para diversos cânceres (Holick, 2006, 2008). Grant et al (2006^a) em estudo considerando a taxa de mortalidade associada à idade e também ao consumo de álcool, hereditariedade hispânica, câncer de pulmão, pobreza e urbanização sugerem que a incidência solar é inversamente associada com a taxa de mortalidade por câncer mesmo considerando estes fatores de risco. Além disso, em um estudo relacionado à latitude e radiação solar relata-se que a taxa de sobrevivência em 5 anos para pacientes com câncer de mama, próstata, cólon, ovário e linfoma não-Hodgkin foi 20-50% maior nos países com latitude 50° N em relação àqueles com latitude 55° N. Este fato pode estar

relacionado a maior síntese da vitamina D em regiões com maior incidência de raios solares (Grant et al,2006B).

De acordo com os dados citados sugere-se que menor nível de exposição solar relacionado à deficiência mesmo leve da forma precursora da vitamina D, esteja associado a um maior risco de desenvolver alguns tipos de câncer bastante comuns na atualidade, como mama (Gorham et al,1990), cólon (Garland et al.,1990) e próstata (Schwartz GG et al., 1990). Além disso, estudos recentes indicam que a alta exposição à luz ultravioleta esteja associada a um menor risco de incidência de linfomas não Hodgkin (Smedby et al., 2005) e que pacientes com diagnóstico de melanoma e maior exposição solar apresentam melhor prognóstico em relação àqueles expostos a menor insolação (Berwick et al., 2005). Outros estudos apontam redução do risco para câncer de mama associado a uma maior ingestão de cálcio e vitamina D em mulheres pré-menopausadas (Shin et al 2002; Lin et al 2007). Sendo assim, a ingestão ou suplementação de vitamina D via dieta, e ainda a exposição solar, relacionada a gênese da vitamina D, pode ser um fator protetor contra o câncer (Ainsleigh, 1993) inclusive o de mama (Gorham et al,1990; Palmieri et al, 2006).

A vitamina D pode inibir o desenvolvimento de lesões mamárias e do câncer de mama. O tratamento com 25(OH)D3 em cultura organotípica de glândulas mamárias derivadas de camundongos knockout para 1 α -hidroxilase inibiu lesões alveolares mamárias induzidas por glicocorticóides (DMBA) de maneira estágio-dependente (Peng et al, 2008). Além disso, em ratos expostos a carcinógeno químico, a administração de análogo da vitamina D causa redução na incidência e maior latência no aparecimento do câncer de mama.

Esta ação quimiopreventiva parece mais importante durante a fase de promoção do tumor (Murillo et al., 2005; Peng et al, 2008). Entretanto a associação entre vitamina D e câncer em seres humanos ainda não está clara e estudo clínico prospectivo mostrou que a reposição de vitamina D e cálcio não reduziu a incidência de câncer colorretal (Wactawski-Wende et al., 2006). Neste estudo foram incluídas 36.282 mulheres, metade das quais realizou suplementação de cálcio e vitamina D (400 IU). No início do estudo, a ingestão média de vitamina D, incluindo dieta e suplementos, era de 367 IU, relativamente alta nos dois grupos, quando se considera a população em geral, e praticamente atingiu aquela preconizada nos Estados Unidos. Cerca de 60% e 70% das mulheres participantes tomou pelo menos 80% da medicação prevista durante 6 anos. Determinação da concentração sérica de 25(OH)D3 após 2 anos de seguimento revelou que esta foi 28% maior no grupo que realizou a suplementação em relação ao grupo que recebeu placebo (n=220 em cada grupo). Apesar disso, após seguimento médio de 7 anos não se observou diferença na incidência de câncer colorretal entre os dois grupos. Dentre os fatores que podem ser aventados para a negatividade do estudo está o tempo de seguimento curto, visto que o tempo de latência de evolução do câncer colorretal pode ser longo, entre 10 a 20 anos, e dose de suplementação, que pode ter sido baixa visto que estudos posteriores sugerem uso de doses mais altas.

Chlebowski et al (2008) realizaram um estudo randomizado com mulheres pós menopausadas para testar a hipótese de que a suplementação com cálcio (1000mg) e vitamina D (400UI/dia) reduziria o risco de desenvolver câncer de mama e de colorretal. Neste estudo, a incidência de câncer de mama foi similar

entre o grupo com suplementação (n=528) e o grupo sem suplementação (n=546). Além disso, os níveis séricos de 25(OH)D₃ não foram associados com o risco subsequente de câncer de mama.

Por outro lado, realizou-se a dosagem sérica de 25(OH)D₃ de mulheres em amostras de sangue de 306 pacientes que desenvolveram câncer colorretal e igual número de mulheres que não desenvolveram a doença, as quais foram pareadas quanto à idade, etnia e data da coleta do sangue. Nesta análise observou-se uma tendência a maior incidência de câncer colorretal em mulheres que apresentavam menor nível sérico inicial de 25(OH)D₃ favorecendo a hipótese de um efeito protetor de vitamina D no desenvolvimento do câncer.

Resultado similar foi encontrado por Goodwin et al. (2009) num estudo que avaliou os níveis de 25(OH)D₃ em 512 pacientes com câncer de mama, num seguimento de 11.6 anos, cujos níveis deficientes ou insuficientes foram relacionados com recorrência a distância e morte .

A vitamina D controla o metabolismo de cálcio e fósforo para o desenvolvimento normal e mineralização do esqueleto saudável. A vitamina D, produzida na pele pela ação dos raios solares (converte 7-deidrocolesterol em pré-vitamina D₃ na pele; Cui & Rohan, 2006) ou ingerida via dieta (colecalfiferol, vitamina D₃, oriunda de fonte animal e ergocalciferol, vitamina D₂, oriunda de fonte vegetal; Cui & Rohan, 2006), é biologicamente inativa e requer uma hidroxilação obrigatória pela enzima 25-hidroxilase no fígado para 25-hidroxivitamina D₃ e, posteriormente, nos rins é convertida para 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) pela enzima 1 α -hidroxilase. A 25-hidroxivitamina D₃ é a principal forma circulante sendo o principal indicador do

estado corpóreo de vitamina D enquanto a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é a forma biologicamente ativa.

O catabolismo se dá através da ação da enzima 24-hidroxilase, cuja abundância é controlada pela própria VD, criando-se assim um mecanismo de retro-controle em que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ativa induz a síntese da enzima, dando origem a metabólitos menos ativos, reduzindo os níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Brown, 1999; Holick, 2006). Segundo Townsend et al (2005) uma expressão desregulada da enzima 24-hidroxilase pareceu anular o efeito promovido pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no tecido tumoral mamário. Por outro lado, uma inibição *in vitro* de 24-hidroxilase causa um aumento da resposta antiproliferativa mediante a $1,25$ -dihidroxitamina D_3 .

Avaliamos a funcionalidade da via da vitamina D em pacientes com carcinoma de mama e observamos que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, mas não a $25(\text{OH})\text{D}_3$ sérica, foi menor em pacientes com câncer de mama quando comparadas a mulheres sem câncer de mama. A expressão tecidual de VDR, 1α -hidroxilase e 24 hidroxilase foram similares no tumor de pacientes com câncer em relação a tecido mamário de mulheres sem câncer (Lyra et al., 2006). Outros autores também encontraram menor concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ (Lowe et al., 2005, Bertone-Johnson et al., 2005) e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Janowsky et al., 1999) em pacientes com câncer de mama em relação a mulheres sem a doença.

Hormônios esteroídicos e retinóides, sendo lipofílicos, são transportados por proteínas carreadoras no sangue. Após dissociação destes carreadores, tais hormônios se difundem pela membrana celular e se ligam a receptores específicos no núcleo ou citosol (Lodish et al, 2000) que resultam em respostas genômicas e não genômicas (Mizwicki et al, 2009). Um dos membros da

superfamília de receptores nucleares é composto pelo receptor de vitamina D (VDR) o qual media o efeito regulatório da 1,25-dihidroxitamina D_3 e cuja expressão já foi descrita em células tumorais mamárias (Freake et al, 1984; Colston et al, 1989; Pendas-Franco et al, 2007).

Um pré-requisito essencial para a modulação gênômica via 1,25-dihidroxitamina D_3 é a localização do receptor de vitamina D_3 (VDR) próximo à maquinaria de transcrição basal. Isto ocorre pela ligação do VDR ao elemento de resposta ao receptor de VD (VDRE) de um gene responsivo a $1,25(OH)_2D_3$. O domínio de ligação ao DNA (DBD) do VDR entra em contato com uma seqüência hexamérica de DNA, ou seja, uma seqüência padrão de seis nucleotídeos específicos que apresentam uma região consenso com o domínio de ligação do receptor. Para a ligação de um complexo estável DNA-proteína, deve haver a formação de homo ou heterodímeros com um outro receptor nuclear a fim de que ocorra uma ligação eficiente ao DNA. As VDREs simples são formadas por duas seqüências padrão de seis nucleotídeos, separada por três nucleotídeos. Na maior parte dos casos o receptor que participa do heterodímero é o receptor de ácido retinoico (RXR) (Brown et al, 1999; Dunlop et al, 2004). Sendo assim, o complexo receptor-hormônio atuará no DNA nuclear nos elementos de resposta à vitamina D (VDRE) a fim de alterar a transcrição de genes responsivos à VD (Jones et al, 1998). O RNAm de VDR contém aproximadamente, 4.6kb, os quais traduzem uma proteína de 50kd em humanos (Jones et al, 1998).

Existe também a ação da $1,25(OH)_2D_3$ por uma via não genômica, rápida e que não depende de transcrição. Não se sabe que sinal que desencadeia a cascata, mas estudos descrevem o envolvimento de um

receptor de membrana-não-clássico (memVDR) e uma proteína-ligante de resposta rápida associada a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de membrana ($1\alpha,25\text{D}_3$ -MARRS) (Nemere *et al.*, 2004). Tal mecanismo parece estar vinculado ao metabolismo do cálcio, pois promove uma rápida absorção intestinal de Ca^{2+} , que envolve inúmeras vias de ativação, como a da proteína kinase C (PKC), que resulta na abertura rápida de canais de Ca^{2+} , aumentando o Ca^{2+} intracelular (Norman *et al.*, 1999; Falkenstein *et al.*, 2000 (Wali *et al.*, 1990; Feldman *et al.*, 2001; Mizwicki *et al.*, 2009).

Estudos *in vitro* com linhagens celulares apontam para o efeito antiproliferativo da forma ativa de vitamina D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, bem como de alguns de seus principais análogos, EB1089 (Sundaram *et al.*, 2003) e $1\alpha(\text{OH})\text{D}_5$ (Moriarty *et al.*, 2005). Este efeito parece ser dependente do receptor de vitamina D. Células epiteliais normais (HME) expressam VDR e também 1α -hidroxilase (CYP27b1) sofrendo inibição da proliferação quando tratadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ou $25(\text{OH})\text{D}_3$ (Kemmis *et al.*, 2006). Hipóteses relatam que o processo de transformação pode associar-se com alterações na via de sinalização da vitamina D. Linhagens de tumor mamário receptor positivas (VDR(+)) BT474 e MCF7, mas não linhagens altamente metastáticas VDR(-) como MDA-MB-435 e MDA-MB-231, demonstraram inibição da proliferação após o tratamento com análogo da vitamina D, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_5$ (Mehta, 2003).

Um modelo de transformação mamária utilizou a linhagem HME para derivar duas outras linhagens, uma contendo o SV40, a HME^{LT} , e a outra contendo ambos SV40 e o oncogene H-ras mutado, a HME^{PR} (Elenbaas *et al.*, 2001). Detectou-se redução da expressão protéica de VDR e CYP27b1 conforme a transformação mamária (Kemmis *et al.* 2008). Além disso, também

foi associada com diminuição da sensibilidade para inibição da proliferação, mostrando que a via pode ser alterada com a progressão tumoral.

A inibição da progressão no ciclo celular pode ocorrer na fase G1 pela indução da transcrição de inibidores de CDK, p21^{WAF1/CIP1} devido ao elemento responsivo a vitamina D presente no promotor de WAF1 (Saramäki et al, 2006) e de TGF-B2 (Mercier et al, 1996; Zhu et al, 1997; Narvaez et al, 1997; Wu et al, 1999; Wang et al, 2000; Colston et al, 2002; Byrne et al, 2006), pela transcrição de p27^{KIP1}, alvos genômicos do complexo 1,25(OH)₂D₃ - VDR (Wang et al, 2000; Bortman et al, 2002; Katayama et al, 2003).

Diversos autores estudaram o efeito antiproliferativo da vitamina D sobre linhagens mamárias normais e tumorais. Hager et al (2001) observaram a parada do ciclo celular em G0/G1 pelo aumento de p21 e p27 em linhagens de células escamosas de câncer de cabeça e pescoço após tratamento com 1,25(OH)₂D₃. Moffatt et al (2001) propuseram um modelo no qual a redução da proliferação é mediada pela elevação de p21 em linhagens de células tumorais prostáticas. Já a linhagem SC-3 oriunda de carcinoma mamário murino apresentou inibição do crescimento mediado por 1,25-dihidróxivitamina D₃ mesmo quando estimulada por testosterona fator de crescimento andrógeno (Kawata et al, 2006)

O cultivo de linhagens celulares não considera a interação entre epitélio e estroma. A influência do estroma é deveras importante para o desenvolvimento do epitélio mamário. Sob condições normais o estroma constitui uma importante barreira para a transformação epitelial (Silberstein et al, 2001). A intercomunicação entre as células epiteliais e o microambiente mantém a organização epitelial e modula a inibição do crescimento (Bhowmick

& Moses, 2005). Entretanto, o compartimento estromal sofre mudanças em resposta a lesões epiteliais emergentes e a subversão dos sinais epitélio-estroma pode apresentar um papel determinante para iniciação e progressão do câncer de mama (Silberstein, 2001; Kim et al, 2005; Albini & Sporn, 2007).

Gache et al (1999) utilizaram um outro modelo em que dois tipos celulares são cultivados separados somente por uma membrana porosa, a co-cultura, no qual fibroblastos estimularam o crescimento de células epiteliais normais e tumorais através de fatores parácrinos. Contudo, a adição de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e EB1089 (10nM e 0,1nM, respectivamente) ao meio condicionado de fibroblastos promoveu redução da proliferação somente nas células epiteliais tumorais. Além disso, as células não entram em contato íntimo, somente há atuação de fatores solúveis que tais células produzem.

Um outro modelo para estudo da ação hormonal é a cultura de tecidos. Neste caso preserva-se a arquitetura estrutural do tecido propiciando condição similar, mais próxima àquela encontrada *in vivo*, podendo-se utilizar concentrações fisiológicas até farmacológicas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Barbosa et al (2004), utilizando este modelo avaliaram o efeito do tratamento com vitamina D sobre secções de tecido tumoral mamário no sistema ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA) e Eigeliene et al. (2006) investigaram a ação de estradiol e medroxiprogesterona em proliferação, apoptose e diferenciação. Uma outra abordagem deste modelo foi utilizada por Sobral et al (2008) que investigaram se trios de genes poderiam classificar tumores submetidos à quimioterapia neoadjuvante em sensíveis e resistentes. Dada à importância do componente estromal na modulação e contribuição da progressão do câncer em modelos animais, faz-se de suma importância

elucidar a contribuição do estroma e compreender as consequências das mudanças neste compartimento e de como estas se relacionam com o câncer de mama em humanos (Finak et al, 2008).

Acredita-se que a interação epitélio-mesênquima possa influenciar vários aspectos do comportamento das células e, inclusive, modificar a resposta ao tratamento. Kuperwasser *et al* (2004) mostraram que fibroblastos transformados ao serem implantados em camundongos NOD/SCID imunocomprometidos (*nonobese diabetic/severe combined immunodeficient*), juntamente com células epiteliais mamárias oriundas de mamoplastia, levam à formação do carcinoma mamário. Isto porque o microambiente do câncer é parte integral de sua anatomia e fisiologia, ademais, sua funcionalidade não pode ser completamente dissociada das células cancerosas (Albini & Sporn, 2007). Por outro lado, estudos *in vivo* refletem uma interação complexa de múltiplos fatores e não permitem avaliar a ação exclusiva de um hormônio específico. Desta forma, alguns trabalhos de nosso laboratório vêm se desenvolvendo de maneira a estudar a interação entre as células tumorais e os fibroblastos, principal tipo celular do tecido estromal, tanto no tumor primário (Rozenchan et al, 2009), quanto no linfonodo axilar comprometido ou não por células tumorais nas pacientes com câncer de mama (Folgueira et al, pôster 5016, AACR, 2006).

Outra observação merece ser considerada. A inibição de proliferação de culturas celulares de câncer de mama ocorre mediante tratamento curto (6-24 horas) com concentrações farmacológicas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Swami et al, 2003; Townsend et al, 2006; Peng et al, 2007). A ação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em concentrações próximas à fisiológica na expressão gênica é pouco clara e

merece grande consideração visto que esta é a concentração passível de ser obtida *in vivo*. Estudo de farmacocinética indica que a concentração alcançada *in vivo* após administração via oral de altas doses de calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) é de até 0.5nM (cerca de 270pg/ml) sem hipercalcemia, indicando que a vitamina D em doses relativamente altas não é tóxica (Smith et al, 1999).

Como a forma mais ativa no controle da proliferação, apoptose e diferenciação celular é a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a qual tem maior afinidade pelo receptor, nosso objetivo é avaliar os efeitos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em concentração próxima à fisiológica (0,5nM) (Smith et al, 1999) e farmacológica (100nM) em cultura de tecido. Além disso, avaliaremos a expressão do gene alvo, 24 hidroxilase (cuja indução ocorre de forma direta e indica a integridade da via), bem como de VDR. Um outro objetivo é avaliar o perfil de expressão gênica após tratamento *in vitro* com vitamina D em fatias de tecido tumoral mamário retirados durante a cirurgia de ressecção mamária. Como alguns estudos (Cross et al., 2001; Anderson et al., 2006) sugerem que pode haver desregulação da via de sinalização da vitamina D conforme a progressão mamária; avaliaremos se os genes candidatos modulados pelo tratamento com vitamina D em fatias de tecido, também o são num modelo de progressão mamária constituído pelas linhagens HME, HME^{LT}, e HME^{PR} e linhagem tumoral bem estabelecida, MCF7.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no perfil transcricional de cultura organotípica de câncer de mama.

2.2 Objetivos Específicos

1. Estabelecer uma cultura primária das secções de tecido tumoral mamário como modelo *in vitro* que preserve a interação epitélio-mesênquima.

2. Determinar a eficiência do tratamento *in vitro* com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0.5nM e 100nM) através da indução do seu gene alvo 24-hidroxilase (CYP24A1).

3 Determinar os genes diferencialmente expressos, através da metodologia de *cDNA microarray*, após o tratamento *in vitro* com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por 24 horas com uma concentração de 0,5 e 100 nM em secções de tecido tumoral mamário;

4. Reavaliar a expressão dos genes candidatos em segundo grupo de amostras após tratamento *in vitro* com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0.5nM e 100nM) por qPCR.

5. Avaliar a expressão dos genes candidatos em um modelo *in vitro* de progressão do câncer de mama composto por 3 linhagens celulares originadas de cultura primária de células epiteliais mamárias normais: HME, HME^{LT} e HME^{PR(LT+Ras)} e também na linhagem epitelial tumoral, MCF7 tratadas com 0.5nM e 100nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

3. Casuística

3.1 Pacientes

Neste estudo foram incluídas de modo prospectivo 22 pacientes pós-menopausadas atendidas no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), com hipótese diagnóstico comprovado por biópsia de carcinoma invasivo EC I a III não submetidas à quimioterapia neoadjuvante. O recrutamento foi realizado pelo Dr. Eduardo Carneiro Lyra e Dra Ana Paula Santana de Abreu, mastologistas do IBCC. Paralelamente foram incluídas de modo prospectivo mais 3 pacientes atendidas no Hospital A.C. Camargo pela Dra. Maria do Socorro Maciel, mastologista do Hospital A.C. Camargo, pacientes com as mesmas características descritas previamente.

Este trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do IBCC, ao Comitê de Ética do Hospital A.C. Camargo e à Comissão de Ética para Análise de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) sob o protocolo de nº626/6, sendo aprovado em todas instituições (carta de aprovação em anexos). Todas as pacientes, após serem informadas sobre a pesquisa, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os critérios de inclusão e exclusão estão mais detalhados abaixo:

3.1.1 Critérios de inclusão

1. Pacientes pós menopausadas com idade entre 45-77 anos;
2. Carcinoma invasivo de mama comprovado por exame histopatológico de congelação na ocasião da biópsia incisional;
3. Ausência de metástase à distância.

3.1.2 Critérios de exclusão

1. História de cálculo renal ou insuficiência renal;
2. História de hipo ou hipercalcemia;
3. Uso atual de corticosteróides;
4. Pacientes que realizaram quimioterapia, hormonioterapia ou radioterapia prévias;
5. Pacientes que participam de outros estudos clínicos enquanto admitido neste protocolo;
6. Pacientes com história de doença de paratireóide;
7. Paciente que apresentava qualquer outra condição ou terapia que possa indicar um risco a paciente ou interferir nos objetivos do estudo.

As características das pacientes recrutadas encontram-se na tabela 1. A idade mediana das pacientes foi de 57 (49 a 76), cerca de 62% e 57% das pacientes apresentam receptor de estrógeno e progesterona positivos, respectivamente.

Tabela 1. Características das amostras de pacientes coletadas.

Amostra	Tipo histológico	LN	Idade	RE	RP	ErbB2	EC
1	CDI	-	72	+	+	+	IIA
2	CDI	+	56	+	+	+	IIIC
3	CLI	+	49	-	-	-	IIIC
4	CDI	-	54	-	-	-	IIA
5	CDI	+	62	+	+	-	IIIC
6	CDI	+	70	-	-	+	IIIC
8	CLI	+	69	+	+	-	IIIA
9	CLI	-	56	+	+	-	IIA
10	CDI	-	61	+	-	-	I
11	CDI	+	74	+	+	-	IIIA
12	CDI	-	56	-	+	-	I
13	CDI	-	57	+	+	+	IIA
14	CLI	-	56	+	+	-	I
15	CDI	+	76	-	-	-	IIIC
16	CDI	+	52	+	-	-	IIA
17	CDI	-	61	+	+	+	I
18	CLI	NA	51	-	-	+	NA
19	CDI	+	66	-	-	-	IIB
20	CDI	+	55	-	-	-	IIA
21	CDI	+	57	+	+	-	IIB
23	CLI	+	66	+	+	+	IIIC

Tipo histológico: CDI-carcinoma ductal invasor, CLI-carcinoma lobular invasor, CI-Carcinoma mamário invasor; LN- Comprometimento de linfonodos: (-) negativo, (+) positivo; Receptor de Estrógeno (RE) e de Progesterona (RP): (-) ausência, (+) presença, (NA) não avaliado, Expressão de ErbB2: (-) ausência, (+) presença. A expressão dos seguintes antígenos foi pesquisada no material discriminado, utilizando-se o método do complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase.

4. Métodos

4.1 Coleta e Transporte das Amostras

Foram coletadas amostras do tumor de cerca de 1,5cm³, imediatamente após a realização da cirurgia mamária, tanto para cultura de tecidos como para conservação em formol 10% tamponado. A análise histopatológica da peça cirúrgica confirmou a natureza neoplásica da lesão.

As amostras destinadas à cultura foram acondicionadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Nova Iorque, EUA), acrescido de ampicilina (concentração final 100 µg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil), estreptomicina (concentração final 100 µg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil) e fungizona (concentração final 2,5 µg/ml) a 4°C durante o período de transporte até o Laboratório de Investigação Médica (LIM 24) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.2 Processamento das amostras

As amostras de tecidos foram seccionadas em fatias de cerca de 350µm a 800µm em um fatiador de tecido fresco (Krumdieck®-Alabama Research and Development Corporation, Birmingham, AL) (Krumdieck, C, A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. Anal Biochem 1980, 104:118-123). Todo o procedimento foi realizado em um fluxo laminar (Veco do Brasil Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda, Unicamp, Brasil) após esterilização do aparelho por luz UV.

A espessura das fatias foi confirmada após mensuração micrométrica em um grupo de 5 amostras escolhidas aleatoriamente. Para isso avaliamos as fatias emblocadas em parafina e, após secção transversal, sobrepusemos um

retículo com uma escala de 0,05mm (HOLTERMANN, Comercial e Técnica Ltda, São Paulo) e mensuramos a fatia com o auxílio de uma lupa.

O fatiador Krumdieck® é de funcionamento automático, totalmente desmontável e construído em aço inoxidável e vidro, o que permite esterilização por meio de calor seco. Este aparelho consiste em dois compartimentos contíguos comunicantes, uma câmara de corte (aonde o fragmento do tecido é fatiado), e um vaso coletor (aonde as fatias são recolhidas). Durante o funcionamento do equipamento, estes compartimentos permanecem imersos em solução salina tampão (PBS), que os percorre por meio de um fluxo produzido por uma bomba. O fragmento do tecido fresco a ser fatiado é depositado em um poço cilíndrico, na câmara de corte e, abaixo deste cilindro situa-se uma lâmina cortante que, por meio de um movimento oscilatório horizontal, produz as fatias. A espessura da fatia é dada pelo ajuste da altura da base do poço cilíndrico e também pela compressão manual do fragmento por meio de um pistão. As fatias produzidas são então dirigidas ao vaso coletor e recolhidas pela abertura de uma válvula (Figura 01).

Figura 1. Representação esquemática do fatiador de tecido fresco Krumdieck®. (A) localização da lâmina cortante, (B) poço cilíndrico aonde o tecido a ser fatiado é depositado, (C) sentido do fluxo da solução salina tampão entre os dois compartimentos, (D) vaso coletor, (E) base do cilindro que é ajustada conforme a espessura da fatia, (F) válvula de abertura para recolhimento das fatias. Fonte: Parrish et al., (1995)

4.2.1 Cultura de secção de tecido mamário e tratamento com vitamina D

Foram realizadas fatias de câncer mamário (Figura 2) em amostras de pacientes com o Fatiador Krumdieck. A espessura do corte variou entre 350 e 800µM. O tempo entre a coleta e a secção foi o menor possível, ao redor de 4 horas.

As fatias de tecido foram cultivadas em placas de 24 poços com 2 cm² de área (Nunc, Dinamarca), sendo uma fatia por poço. O meio de cultura foi o RPMI 1640 (Gibco, Nova Iorque, EUA), suplementado com 10 % de soro fetal bovino, inativado por calor (Gibco, Nova Iorque, EUA), contendo ampicilina (concentração final 100 µg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil). e estreptomicina (concentração final 100 µg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil). A quantidade de meio por poço foi de 2ml. Os poços contendo as fatias a serem tratadas receberam 2 µl vitamina D (Calbiochem, EUA- cat.nº679101) adicionada ao

meio. As concentrações finais utilizadas foram 0,5nM (concentração fisiológica) e 100nM (concentração farmacológica) e, nos poços designados como controle, as células receberam o mesmo volume do veículo, 0.1% etanol (Fan et al; 2009). O período de tratamento foi de 24 horas durante as quais as placas foram mantidas em uma incubadora de umidade controlada a 37°C em atmosfera constante de 5% de CO₂.

Figura 2. Figura ilustrativa de secção de tecido tumoral mamário. Espessura da fatia 400µm. Para obtenção da concentração de 0,5nM adicionamos 2 µl de vitamina D a 500 nM em 1,98ml de meio de cultura e para a concentração de 100nM adicionamos 2 µl de vitamina D a 100 µM em 1,98ml de meio de cultura. O período de tratamento foi de 24 horas mantidas a 37°C em de 5% de CO₂. Microscopia óptica NIKON Eclipse E600. Aumento 4x.

Após o término deste período de cultivo as fatias foram retiradas do meio de cultura e armazenadas em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA e também em formol tamponado. Para confirmação da presença de neoplasia viável as lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris.

4.3 Cultura de células epiteliais mamárias humanas

O modelo *in vitro* de progressão do câncer de mama foi gentilmente disponibilizado pela Dra. JoEllen Welsh (GenNysis Center for Excellence in

Cancer Genomics, University at Albany, Albany, NY). Este modelo é composto por 3 linhagens celulares originadas de cultura primária de células epiteliais mamárias normais: HME (célula epitelial mamária humana imortalizada pela transfecção do gene da transcriptase reversa da telomerase, hTERT, o qual não altera o fenótipo normal destas células), HME^{LT} (célula epitelial mamária humana imortalizada pela transfecção do hTERT e do antígeno T grande do retrovírus SV40) e HME^{PR} (célula epitelial mamária humana imortalizada pela transfecção do hTERT e do antígeno T grande do retrovírus SV40 e ainda super-expressando o oncogene mutante H-Ras). Estas linhagens foram cultivadas em meio de cultura 171 (Cat. Nº M-171-500, Cascade Biologics, Portland, OR, EUA) suplementado com 0,4% v:v extrato pituitário bovino, 5mg/L insulina bovina, 0,5 mg/L hidrocortizona e 3µg/L de fator de crescimento epidermal humano (Cat. Nº S-015-5, *Mammary Epithelial Growth Supplement*, Cascade Biologics, Portland, OR, EUA). A linhagem de câncer de mama, MCF7, derivada de infusão pleural de paciente com adenocarcinoma, foi cultivada em meio de cultura alfa MEM (Gibco, Nova Iorque, EUA), suplementado com 5 % de soro fetal bovino (Gibco, Nova Iorque, EUA). Todas as linhagens celulares foram mantidas a 37°C em uma incubadora de umidade controlada em atmosfera constante de 5% de CO₂.

4.3.1 Caracterização do modelo de progressão do câncer

Estudo prévio relatou que células epiteliais mamárias HME expressam citoqueratina 18 e E-caderina (Elenbaas et al, 2001). Seu padrão morfológico arredondado e crescimento em monocamada é típico do crescimento de células epiteliais normais. Entretanto, em células transformadas com SV40 e H-

Ras pode-se observar mudanças no padrão morfológico. Células HME^{LT} apresentam formato fusiforme em comparação com o tipo celular precursor, enquanto as células HME^{PR} perdem completamente a morfologia epitelial, adquirindo uma aparência fibroblástica, e um crescimento independente de inibição por contato, tornando-se tumorigênica em camundongo imunodeprimido. As mudanças observadas no padrão morfológico durante a progressão celular são compatíveis com a perda progressiva da expressão de E-caderina, culminando com sua completa extinção nas células HME^{PR} (Kemmis et al, 2008).

4.4 Ensaio de incorporação celular de bromodeoxiuridina (BrDU) em secção de tecido mamário tumoral

A avaliação da proliferação celular em secção de tecido tumoral foi embasada na capacidade das células viáveis em incorporar bromodeoxiuridina (BrDU) durante sua duplicação.

A bromodeoxiuridina 10ug/ml (Calbiochem, CA, EUA) foi adicionada ao meio de cultura celular (descrito acima), sendo a incubação realizada por 16h. O cultivo das amostras ocorreu em placas de poliestireno contendo seis poços, sem e com inserto, isto é, uma membrana de policarbonato tratada cujo poro é de 3.0µm, (*transwell* Costar nº 34143). Esta permite que o tecido fique na interface para receber nutrientes pela superfície inferior e ser oxigenada pela face superior. O volume de meio celular contido nos poços com inserto e sem inserto foi, respectivamente, de 1,2ml e 2ml. Após a incubação, todo meio foi retirado, as fatias foram embebidas em tampão PBS, e depois, fixadas em paraformaldeído 4% por 24horas, sendo posteriormente resguardadas em tampão PBS. Procedeu-se com a desnaturação das amostras por 30 segundos

com HCl 2N, e inativação com tampão borato (ácido bórico 0,1M ; NaOH 0,15M; pH 8.4) por 10 minutos. Por fim, houve incubação em tampão PBS por 10 minutos. As fatias foram cuidadosamente retiradas e posicionadas na lâmina de vidro previamente lavada e demarcada (com esmalte ou silicone) dentro de uma câmara úmida e escura. Permeabilizou-se o tecido com tampão PBS contendo 0,3% de Triton por 10 minutos. Cinquenta microlitros de solução de bloqueio foi adicionada à lâmina (tampão PBS contendo 0,2% de Triton e 1% de soro de cavalo) para uma incubação de 1 hora. Retirou-se a solução com papel absorvente e adicionou-se o anticorpo primário anti-bromodeoxiuridina (anti-BrDu, anticorpo monoclonal gerado em camundongo conjugado a biotina, clone PRB-1, Cat. N° MAB3262, Chemicon®, Millipore, EUA), diluído 1:150 em PBS 0,2% de Triton e 1% de soro de cavalo (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA). Incubou-se por 16 horas a 4°C no escuro e em câmara úmida. Em seguida lavou-se a lâmina três vezes com tampão PBS, proceguindo a incubação por 1 hora com 50ul do anticorpo secundário (Alexa Flúor 488 conjugado a estreptavidina, cat.n° S-11223, Molecular Probes, Invitrogen,EUA) diluído 1:1000 em PBS 0,2% de Triton e 1% de soro de cavalo (Gibco, Nova Iorque, EUA) e também DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, cat.n°.D1306, Invitrogen, EUA) diluído 1:1000. Por fim, as lâminas foram lavadas com tampão PBS e montadas utilizando-se cola *FluorSave* (Calbiochem, CA, EUA) Cat n° 345789.

A contagem do número de células foi realizada com o programa *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) cuja análise dá-se pela contagem automática do número de partículas, neste caso, contagem do número de núcleos corados com DAPI, e também co-corados com bromodeoxiuridina. A análise estatística

foi realizada com o programa estatístico Statistical Package for the Social Sciences, versão 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

4.5 Expressão imunocitoquímica de DPP4 e CD14 em modelo de transformação epitelial mamária

Inicialmente foram semeadas 8×10^4 células por compartimento das linhagens celulares HME, HME^{LT}, HME^{LT+Ras} e MCF7 em lâminas de vidro contendo quatro câmaras (cat.154917, Nalge Nunc International, IL, EUA). Em seguida à aderência das células foi realizado o tratamento com 100nM de VD por 24 horas. Após este período, todo o meio de cultura foi retirado, sendo efetuadas duas lavagens com tampão PBS, e fixação em paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, MO, EUA) por 15 minutos. Cerca de três lavagens por 3 minutos com tampão PBS foram realizadas, seguindo-se incubação por 10 minutos com tampão PBS contendo 0.25% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, MO, EUA), somente nas lâminas designadas para o anticorpo contra o receptor de vitamina D. Mais três lavagens com tampão PBS por 5 minutos foram realizadas, e então foi aplicada a solução de bloqueio contendo 1% de soro albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, MO, EUA), 10% de soro de cabra (Dako Corporation, Dinamarca) e 0,1% de Tween (Sigma-Aldrich, MO, EUA) em tampão PBS por 30 minutos. Decantou-se a solução prévia e realizou-se a incubação por 12 horas a 4 °C em câmara úmida com o anticorpo primário diluído em tampão PBS com 1% BSA: anticorpo policlonal de coelho anti-DPP4 humano (cód.ab61825, Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA) numa diluição de 1:300 e anticorpo policlonal de coelho contra CD14 humana (clone M305, sc9150, Santa Cruz, CA, EUA) numa diluição de 1:50. Decantou-se o anticorpo

primário e procederam-se 3 lavagens por 5 min com tampão PBS contendo 0,1% de Tween. Realizou-se incubação em câmara úmida com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo *Alexa Fluor 488* (cat. A11079, lote 522263, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) ou anticorpo anti-IgG de coelho *Alexa Fluor 488* (cat. A11070, lote 400884, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA), ambos diluídos 1:700 em PBS com 1% BSA, em temperatura ambiente por 1 hora. Após a incubação as lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos cada, com tampão PBS contendo 0,1% de Tween. A montagem das lâminas com lamínulas foi realizada com reagente adesivo contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (*Pro-Long Gold Antifade Reagent with DAPI*, cat. P36935, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). Estas mesmas foram visualizadas em microscópio confocal Leica TCS LSI (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e as imagens capturadas e digitalizadas pelo programa Leica LAS (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Estas reações foram realizadas no Gen*NY*Sis Center for Excellence in Cancer Genomics, Department of Biomedical Sciences, University at Albany em colaboração com a professora JoEllen Welsh.

4.6 Western blotting para análise de CA2, CD14, VDR e CYP24

As linhagens celulares HME, HME^{LT}, HME^{LT+Ras} e MCF7 foram subcultivadas em placas de Petri de 100mm numa confluência de 3×10^5 células por placa contendo 10ml de meio de cultura. Vinte e quatro horas após a semeadura foi realizado o tratamento com veículo (etanol) ou 100nM de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (5 μl). Após 48 horas de tratamento, as monocamadas celulares foram raspadas em 500 μl de tampão *laemmli* contendo inibidores de proteases

e fosfatases (10mM benzamidina, 10mM fluoreto de sódio, 100mM vanadato de sódio, 25µg/µl aprotinina, 25µg/µl pepstatina, 25µg/µl leupeptina e 1mM fenilmetilsulfonil) e sonicadas (3 vezes por 10 segundos). A concentração das proteínas do lisato celular foi avaliada pelo *BCA Protein Assay Reagent* (cat. 23227) (Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL, EUA), sendo a concentração das amostras normalizadas de acordo com a menor concentração de proteína total encontrada. Trinta e seis microgramas de proteína total foram separadas num gel de poliacrilamida SDS-PAGE de 7.5% (para o anticorpo anti-CD14), 10% (para o anticorpo anti-VDR) e 12.5% (para o anticorpo anti-CA2) e posteriormente transferidas eletroforaticamente para uma membrana de nitrocelulose. A coloração de *ponceau* foi realizada a fim de visualizarmos se as proteínas foram transferidas para a membrana. Em seguida, uma reação de bloqueio foi realizada por 2 horas em 5% de leite reidratado em tampão PBS contendo 0.02% de azida sódica, e então, as membranas foram posicionadas dentro de tubos de 50ml (Corning Incorporated, NY, EUA) para incubação por 12 horas a 4 °C (em rotação) com os anticorpos primários. Estes foram aplicados numa diluição de 1:200 (VDR, anticorpo monoclonal de camundongo contra VDR humano, clone D6, sc13133, Santa Cruz, CA, EUA), 1:100 (CA2, anticorpo monoclonal de camundongo anti-CA2 humano, clone G2, cód.sc-48351, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA), 1:500 (CD14, anticorpo policlonal de coelho contra CD14 humana, clone M305, sc9150, Santa Cruz, CA, EUA) e 1:200 (CYP24, anticorpo policlonal de camundongo anti-CYP24 humano, cat. H00001591, Lot 08057, Abnova Corporation, Taipei, Taiwan) em 4 ml de leite reidratado a 5% em PBS contendo 0.02% de azida sódica. Finda a incubação, três lavagens com tampão PBS 0.1% Tween foram

realizadas. Anticorpos secundários anti-IgG de camundongo produzido em ovelha (dilução 1:5000, cat.NA931V, lote 370149, GE Healthcare, Reino Unido) e anticorpo anti-IgG de coelho produzido em asno (dilução 1:3000, cat.NA931V, lote 367785, GE Healthcare, EUA), ambos conjugados a peroxidase, foram diluídos em 5ml de leite reidratado a 5% em PBS e incubados com sua respectiva membrana em temperatura ambiente por uma hora a uma agitação constante. Quatro lavagens com PBS 0.1% Tween e uma lavagem com tampão PBS foram realizadas. Bandas imunorreativas específicas correspondendo a VDR, CA2, CD14 e CYP24 foram detectadas por quimioluminescência (cat. 34076, Super Signal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce Biotechnologies, EUA) nas posições 51kDa, 29kDa, 53-55kDa e 55kDa, respectivamente. Aplicação similar das amostras foi confirmada por B-actina (dilução 1:3000; anticorpo monoclonal de coelho anti B-actina humana; clone 13E5, Cell Signaling Technology, Boston, MA, EUA) ou Laminina A/C (dilução 1:50; anticorpo policlonal de cabra contra laminina A/C humana, clone N18, sc6215, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) cujo peso molecular são, respectivamente, 45kDa e 69kDa/62kDa. Estas reações foram realizadas no Gen*NY*Sis Center for Excellence in Cancer Genomics, Department of Biomedical Sciences, University at Albany em colaboração com a professora JoEllen Welsh.

4.7 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

As linhagens celulares HME, HME^{LT}, HME^{LT+Ras} e MCF7 foram subcultivadas em placas de 12 poços (cat.3512, Corning Incorporated, NY, EUA) numa confluência de 1×10^5 células por poço, contendo 2ml de meio de

cultura, a fim de se avaliar se a proteína oriunda do gene CD14 estava sendo secretada para o meio de cultura (sCD14). Vinte e quatro horas após a semeadura foi realizado o tratamento com veículo (etanol) ou 100nM de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1 μl). E após 24 horas de tratamento, os 2ml de meio condicionado foram coletados e centrifugados por 5 minutos a 2000 x g para remoção do debris celular. Cem microlitros do sobrenadante foram utilizados para realização do *Quantikine-Human sCD14 Immunoassay* (cat. DC140, R&D Systems Inc, Mineápolis, MN, EUA) de acordo com a descrição do fabricante. Separadamente realizamos uma diluição seriada do padrão reconstituído de sCD14 (fornecido), em seguida adicionamos 100 μl do diluente RD1W em cada poço a ser utilizado, inclusive aquele que conterá os padrões. Adiciona-se então a amostra e os padrões (em duplicata), incubando-os por 3 horas em temperatura ambiente. Seguem-se quatro lavagens com o tampão de lavagem previamente diluído (solução de surfactante tamponado) e então uma nova incubação por 1 hora com 200 μl de sCD14 conjugado. Aspira-se a solução e realiza-se mais quatro lavagens com o tampão de lavagem. Duzentos microlitros de substrato são adicionados aos poços para uma incubação de 30 minutos protegida da luz. Por fim, utiliza-se 50 μl de ácido sulfúrico a 2N (fornecido) para finalizar a reação, seguindo uma determinação da densidade óptica em leitor de placa (Victor Microplate Reader, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EUA) num comprimento de onda de 490nm. Uma curva padrão foi contruída com os valores dos padrões obtidos (Figura 3) e então a concentração da proteína solúvel sCD14 foi determinada nos meios condicionados. Este ensaio imunoenzimático foi realizado no Gen*NY*Sis Center for Excellence in Cancer Genomics, Department of Biomedical

Sciences, University at Albany em colaboração com a professora JoEllen Welsh.

Figura 3. Curva padrão para proteína solúvel sCD14, construída a partir da absorbância média de cada padrão no comprimento de onda de 490nm. Leitura realizada no leitor *Victor Microplate Reader* (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EUA).

4.8. Tecidos

Os tecidos criopreservados são pulverizados em nitrogênio líquido com Termovac (Telcolab Corporation) e colocados em tubos de 1,7ml juntamente com 600µl de solução de lise (tampão RLT contendo β -mercaptoetanol) contido no *Rneasy mini kit* (cat n° 74104, Qiagen, Alemanha).

4.8.1 Extração do RNA total

A extração do RNA foi realizada com o *Rneasy mini kit* (cat n° 74104, Qiagen, Alemanha) de acordo com a descrição do fabricante. Primeiramente determinamos a quantidade de tecido a ser pulverizada em cada coluna, não excedendo mais que 30mg e embebemos este tecido pulverizado em 600µl de solução de lise (tampão RLT contendo β -mercaptoetanol). A solução foi agitada vigorosamente por 1 minuto e centrifugada por 30 segundos a 16.100 x g. O

sobrenadante removido para outro tubo de 1,7ml. E adicionou-se 600µl de etanol 70% DEPEC, misturando-se bem. A um conjunto de coluna e tubo coletor, adicionou-se 700µl da solução na coluna e centrifugou-se por 30 segundos a 9.300 x g, descartando o eluato (este processo é realizado duas vezes numa mesma coluna). Posteriormente, adicionou-se 700µl do tampão RW1 na mesma coluna e centrifugou-se por 30 segundos a 9.300 x g, descartando o eluato. Adicionou-se 500µl do tampão RPE à coluna e centrifugou-se por 30 segundos a 9.300 x g. Este procedimento foi repetido. Logo após, colocou-se a coluna em um novo tubo coletor, centrifugando-a em velocidade máxima por 1 minuto. Posicionou-se a coluna contendo o RNA num tubo coletor de 1,5ml previamente identificado e adicionou-se 30µl de água livre de RNases. Realizou-se uma última centrifugação a 9.300 x g por 1 minuto de maneira a se obter o RNA no eluato. A concentração das amostras foi determinada pela leitura da absorbância em 260 e 280nm pelo espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies), sendo a pureza determinada pela razão entre os valores de 260/280. A integridade do RNA foi avaliada pelo sistema *Agilent Bioanalyzer* (Model 2100; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) e pelo valor do RIN (*RNA Integrity Number*- dado pelo software da *Agilent*). O *Bionanalyzer* utiliza uma plataforma baseada em microfluidos. Durante o preparo do *chip* um corante foi adicionado ao gel. Com a ajuda de uma “estação de preparação”, os canais do *chip* são preenchidos com o gel misturado com o corante, e então, este se intercala diretamente com o ácido nucléico. Como princípio, este instrumento detecta as biomoléculas pela fluorescência induzida pelo laser a 670-700nm (Schroeder et al.,2006). Neste trabalho utilizamos tal

metodologia para o estudo do RNA total. A imagem de um eletroferograma é gerada e qualidade das amostras foi dada pelo RIN. O RIN varia de 0 a 10 em ordem crescente de integridade. As amostras foram analisadas e as bandas mensuradas.

4.8.2 Tecnologia do *cDNA microarray*

O RNA total foi extraído pelo protocolo do *Rneasy Mini Kit* (Qiagen, Alemanha). A síntese do RNA amplificado foi realizada com o *Two-cycle Target Labeling Kit*, cat. n° 900494 (Affymetrics, Santa Clara, CA, EUA) conforme protocolo do fabricante (Figura 4), bem como a hibridização e aquisição das imagens.

Figura 4. Esquema ilustrativo do primeiro e segundo ciclo de amplificação, hibridização e aquisição de imagens.
Fonte: *Expression Analysis Technical Manual*.

4.8.2.1 Amplificação das amostras de RNA total

Partimos de 100ng de RNAtotal (Figura 5) das amostras de secções de tecido tumoral mamário tratados com veículo, concentração fisiológica (0,5nM) ou farmacológica (100nM) de vitamina D (calcitriol) para realizar a amplificação do RNA (*Two-cycle target labeling kit*). A qualidade deste RNA foi avaliada pelo

perfil de separação eletroforética gerada no aparelho Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) e pela análise do número de integridade do RNA (*RIN- RNA Integrity Number*) que se traduz num algoritmo criado para extrair informação sobre a integridade da amostra de RNA a partir do eletroferograma gerado pelo software do Bioanalyzer. Este considera a distância entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S, bem como a relação 28S/18S. A característica destas amostras está descrita na tabela abaixo (Tabela 2). Como critério de qualidade, estabelecemos que o RIN deveria ser maior que 6.5.

Tabela 2. Características das amostras selecionadas para utilização em técnica de *cDNA microarray*.

Amostra	Tipo histológico	LN	RE	RP	ErbB2	RIN		
						A	B	C
6	CDI	+	-	-	+	6.7	6.6	6.8
11	CDI	+	+	+	-	8.3	8.5	8.1
12	CDI	-	-	+	-	9.2	8.8	8.9
13	CDI	-	+	+	+	7.5	7.3	7.3
15	CDI	+	-	-	-	7.9	7.6	7.3

Tipo histológico: CDI-carcinoma ductal invasor, COM-comedocarcinoma; LN- Comprometimento de linfonodos: (-) negativo, (+) positivo; Receptor de Estrógeno (RE) e de Progesterona (RP): (-) ausência, (+) presença, (ND) não determinado, Expressão de ErbB2: (-) ausência, (+) presença; *RIN*-medida de integridade do RNA, A-amostra controle (veículo: etanol), B-amostra tratada com 0,5nM vitamina D, C-amostra tratada com 100nM vitamina D.

Figura 5. A e B: RNA total das amostras selecionadas para realização de *cDNA microarray*. Eletroferograma gerado pelo *software* do Bioanalyzer (eletroforese em microcanais formados numa matriz de separação) o qual permite a visualização de bandas correspondentes ao RNA ribossomal, 28S e 18S, cuja relação 28S/18S, correspondente a 2:1, é compatível com amostras de boa qualidade. A-amostra controle, B-amostra tratada com 0,5nM vitamina D, C-amostra tratada com 100nM vitamina D.

Síntese de cDNA por dois ciclos

Num tubo de 0,2 ml colocou-se 5 µg de RNA total, adicionando 2 µl do controle de RNA poli-A devidamente diluído, 2 µl de oligo dT-T7 (50 µM) e completando-se com água livre de Rnase para um volume final de 12 µl. Agitou-se cuidadosamente e minifugou-se. Incubou-se por 10 minutos a 70°C e resfriou-se a 4°C por 2 minutos, minifugando posteriormente. Adicionou-se 7µl da primeira mistura (4µl de 5x *First Strand Reaction Mix*, 2µl de nucleotídios

(dNTPs) a 10 mM e 1µl de ditioneitol (DTT) a 0,1M) e novamente misturou-se e minifugou-se. Incubou-se a 42°C por 2 minutos e então adicionou-se 1µl de *SuperScript II*, incubando novamente a mesma temperatura por 1 hora, e então a 4°C por 2 minutos. Adicionou-se 130 µl da segunda mistura (91µl de água livre de Rnase, 30µl de *Second Strand Reaction Mix*, 3µl de dNTPs a 10 mM, 1µl *E.coli DNA ligase*, 4µl *E.coli DNA Polymerase I* e 1µl Rnase H). Incubou-se o volume de 150µl formado por 2 horas a 16°C, logo após, adicionou-se 2µl de *T4 DNA Polymerase*, incubando-se por mais 5 minutos. Ao término da incubação acrescentou-se 10µl de EDTA a 0,5M e procedeu-se com a etapa de purificação.

Purificação da dupla fita formada

Adicionou-se 600µl de *cDNA Binding Buffer* à dupla fita de cDNA sintetizada, agitando por 3 segundos. Observou-se se a mistura adquiriu a cor amarela. Posteriormente aplicou-se 500µl da amostra numa coluna *cDNA Cleanup Spin Column* contendo o tubo de coleta logo abaixo. Centrifugou-se por 1 minuto a 8.000 x g. Descartou-se o conteúdo do tubo de coleta e repetiu-se a centrifugação. Transferiu-se a coluna para um tubo de coleta novo e adicionou-se a mesma quantidade, 750µl, do do tampão de lavagem. Centrifugou-se por 1 minuto a 8.000 x g e descartou-se o conteúdo do tubo de coleta. Abriu-se a coluna e centrifugou-se por 5 minutos na rotação máxima (25.000 x g), descartando o tubo de coleta. Um novo tubo de coleta foi realocado para então adicionar-se 14 de tampão de eluição de cDNA diretamente sobre a coluna. Incubou-se por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugou-se por 1 minuto na rotação máxima (25.000 x g) para que ocorresse a eluição.

Síntese de cRNA biotina marcado

Num tubo de 0,2 ml colocou-se 12µl da dupla fita purificada. Adicionou-se 40µl de uma mistura de 4µl de tampão de transcrição *in vitro*, 12µl de *mix* de *NTP* para marcação *in vitro* e 4µl de *mix* da enzima para transcrição *in vitro* e 8µl de água livre de RNase. Misturou-se, minifugou-se e, posteriormente, incubou-se a 37°C por 16 horas. Procedemos com a purificação do cRNA.

Purificação do cRNA

Acrescentou-se 60µl de água livre de Rnase à reação de transcrição *in vitro* e misturou-se, posteriormente adicionou-se 350µl de tampão de marcação de cRNA. Após breve mistura, acrescentou-se 250µl de etanol ao lisado. Pipetou-se várias vezes para uma boa homogeneização. Aplicou-se a amostra numa coluna cRNA Cleanup Spin Column e acoplou-se a um tubo de coleta. Centrifugou-se por 15 segundos a 8.000 x g, descartando logo após o tubo de coleta. Transferiu-se a coluna a um novo tubo e pipetou-se 500µl de tampão de lavagem para cRNA, repetiu-se a centrifugação, descartando posteriormente o tubo de coleta. Realizou-se nova lavagem e centrifugação, acrescentando-se desta vez 500µl de etanol 80%. Secou-se a coluna centrifugando-a por 5 minutos com a tampa aberta na rotação máxima (25.000 x g) e adicionou-se 11µl de água livre de Rnase diretamente na coluna para que ocorresse a eluição durante a centrifugação de 1 minuto na rotação máxima. Repetiu-se o procedimento. Quantificou-se o cRNA purificado no espectrofotômetro.

A avaliação da qualidade das amostras de cRNA amplificado foi realizada de acordo com o perfil da eletroforese obtido após os dois ciclos de amplificação (Figura 6).

Figura 6. Eletroferograma do cRNA amplificado, biotina marcado, obtido após os dois ciclos de amplificação em amostras de secção de tecido tumoral. O eixo y representa a intensidade de fluorescência enquanto o eixo x representa o tempo da corrida em segundos. A-amostra controle (veículo: etanol), B-amostra tratada com 0,5nM vitamina D, C-amostra tratada com 100nM vitamina D.

Fragmentando o cRNA para hibridização

Antes da hibridização do cRNA amplificado nas lâminas de *cDNA microarray* é necessário fragmentar o cRNA em tamanhos que variam de 35 a 200 bases (*Expression Analysis Technical Manual*, P/N 702232, rev 2, pg 66). Ajustou-se a concentração do cRNA para 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e adicionou-se o tampão de fragmentação (5x). Incubou-se a 94°C por 35 minutos e em seguida colocou-se no gelo. Fez-se necessário avaliar novamente a qualidade das amostras a serem hibridizadas. A figura 7 demonstra um excelente perfil do

cRNA fragmentado das secções de tecido tumoral mamário tratados (B- 0,5nM; C-100nM) ou não (A-veículo) com vitamina D.

Figura 7. Eletroferograma do cRNA biotina marcado após processo de fragmentação. O eixo y representa a intensidade de fluorescência enquanto o eixo x representa o tempo da corrida em segundos. A-amostra controle (veículo: etanol), B-amostra tratada com 0,5nM vitamina D, C-amostra tratada com 100nM vitamina D.

Hibridização

As sondas de cRNA fragmentado e marcado com biotina foram adicionadas à solução de hibridização, e então, aplicadas nos *chips* de *cDNA* *microarray* (“lâmina” de *cDNA* *microarray*) conforme descrito a seguir.

Partiu-se de 20µg da amostra de cRNA fragmentado, adicionando-se 1.7µL de oligonucleotídeo controle B2 (3nM), 5µL de controle eucariótico para hibridização (20x), 1µL de *Herring Sperm DNA* (10mg/mL), 1µL BSA (50mg/ml),

50µL de tampão de hibridização (2x), 10µL DMSO e água para completar um volume final de 100µL. Aqueceu-se a mistura a 99°C por 5 minutos e então a 45°C por 5 minutos. Enquanto isso, incubou-se o *chip* do *array*, previamente lavado com tampão de hibridização 1x, a 45°C por 10 minutos numa rotação constante. Transferiu-se a mistura para a lâmina do *array* GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix Inc., EUA), a qual inclui o genoma humano, retirando-se primeiramente o tampão 1x da mesma, e então incubou-se num forno de hibridização à 45 °C numa rotação de 60rpm por 16 horas.

Seguindo o protocolo as lâminas foram lavadas, digitalizadas e analisadas conforme Affymetrix GeneChip Scanner 3000 e o software *Affymetrix GeneChip Operating* (GCOS).

4.8.2.2 Descrição e leitura dos *Chips* de cDNA microarray

O *chip* de *cDNA microarray* utilizado foi o *Human Genome U133 Plus 2.0* (cat n°520019) (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, EUA). Os *GeneChip probe arrays* foram construídos utilizando uma tecnologia que combina fotolitografia e química combinatória (*Expression Analysis Technical Manual*, pg 16). O *chip* de *cDNA microarray* apresenta cerca de 47.000 transcritos e variantes, dentre os quais 38.500 correspondem a genes humanos bem caracterizados. Cada oligonucleotídeo (*probe*) está localizado em uma região específica denominada *probe cell* a qual contém centenas de milhares a milhões de cópias de um oligonucleotídeo específico (*probe*). Cada transcrito está representado por 11 pares de oligonucleotídeos de 25 mer cada, designados PM (*perfect match*-emparelhamento completo) e MM (*mismatch*-emparelhamento incompleto) (Figura 8). Entre os PM há uma hibridização perfeita e completa entre o oligonucleotídeo (*probe*) e o cRNA alvo, contudo, no MM, há um

despareamento, pois a 13^a base não condiz àquela presente no cRNA alvo. Esta característica do MM aponta para a avaliação das ligações não específicas e ruído de fundo dentro do sistema Affymetrix de análise. Por fim, os transcritos estão representando as 600 bases mais próximas à região terminal 3' do RNAm, pois esta região é mais facilmente convertida em alvo marcado com biotina (Rickardj et al 2007).

Figura 8. Representação esquemática do *probe set* constituído por 11 par de *probes*. O chip de cDNA microarray Human Genome U133 Plus 2.0 array contém 54.000 *probe sets*. PM= emparelhamento completo e MM= emparelhamento incompleto.

Leitura dos *Chips*

Os sinais gerados pela hibridização dos cRNA fragmentados e biotinilados das amostras às sequências presentes nos *chips* de *microarray* foram capturadas utilizando-se um scanner a laser, GeneArray® Scanner 3000 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, EUA); cujo valor do pixel é de 3 µm e o comprimento de onda de 570 nm. O programa de aquisição das imagens é dado pelo *GeneChip® Operating Software* (GCOS).

O *GeneChip® Operating Software* (GCOS) permite a localização dos pontos de cRNA hibridizados no *chip* basendo-se em marcadores de posição, como o Oligo B2, o qual atua como um controle positivo no qual o sinal de sua hibridização indica as bordas do array (*Data Analysis Fundamentals*,pg 36). O

controle do gradeamento faz-se através da formação do nome *GeneChipHG-U133Plus 2*. (Figura 9).

Figura 9. Exemplo de gradeamento correto do *chip cDNA microarray*.

O controle da hibridização é composto por uma mistura de transcritos cRNA biotina-marcados oriundos de *E. coli* denominados bioB, bioC, bioD, bem como um gene recombinante derivado do bacteriófago P1 denominado *cre*, preparados em diferentes concentrações e inseridos na solução de hibridização. O bioB refere-se ao nível de sensibilidade do ensaio, devendo estar presente em pelo menos 50% das vezes em cada ensaio, já o bioC, bioD e *cre* devem estar presente em todas as lâminas de cada ensaio e numa concentração crescente.

Um outro parâmetro é a colocação de um Poli A RNA controle na amostra de RNA a ser amplificada. Estes são genes (*lys, phe, thr, dap, trp*) oriundos do *B. subtilis* e modificados pela adição de uma cauda Poli A de modo que estes sejam dados como “presentes” na lâmina de *cDNA microarray* (*Chip*) numa concentração crescente, respectivamente.

Controles internos mostram a qualidade da amostra de RNA através da relação 3’/5’ para os genes da actina e GAPDH em cada lâmina de microarray, razão que não deve ultrapassar o valor 3 e que apresenta valor mais elevado quando o Two-cycle amplification kit.

No sistema da Affymetrix a intensidade da PM e MM são utilizadas em conjunto para produzir um valor de expressão biologicamente significativo e correção do background (PM-MM). O algoritmo de detecção do sistema

Affimetrix, baseia-se no método PM-MM para determinar a porcentagem de transcritos presentes. Simplificadamente, calcula-se uma razão **R** (*discrimination score*) para cada par de probes e compara-se a um limite pré-estabelecido (predefined threshold):

$$R = \frac{PM-MM}{PM+MM}$$

Onde, **R** descreve uma propriedade básica da habilidade de detectar o transcrito alvo. Ele mede a intensidade específica do par de probes (PM-MM) com a intensidade total da hibridização (PM+MM).

Faz-se um ranqueamento dos valores das PM e MM de 1 a 10 referentes aos 10 pares presentes no *probeset*, e aplica-se o teste de Wilcoxon's (One-Sided Wilcoxon's Signed Rank). O valor de *p* encontrado (*p-value*) irá delinear se o transcrito está presente (exemplo: $p < 0,04$), ausente (exemplo: $p > 0,06$) ou marginalmente presente (exemplo: $0,04 < p < 0,06$) (Tabela 3) (*Data Analysis Fundamentals Manual-Affimetrix*, pg42).

Tabela 3. Porcentagem de transcritos presentes, ausentes e de detecção marginal nas amostras

Amostra		Nº Presentes	Nº Marginais	Nº Ausentes
6	A	50.0%	1.6%	48.4%
	B	50.1%	1.5%	48.3%
	C	50.9%	1.6%	47.5%
11	A	49.2%	1.7%	49.1%
	B	40.1%	1.9%	58.0%
	C	49.4%	1.6%	49.0%
12	A	49.2%	1.5%	49.2%
	B	47.5%	1.5%	50.9%
	C	49.7%	1.6%	48.7%
13	A	47.9%	1.5%	50.6%
	B	49.5%	1.6%	48.9%
	C	46.7%	1.7%	51.6%
15	A	48.2%	1.7%	50.1%
	B	49.5%	1.5%	48.9%
	C	47.6%	1.6%	50.8%

A-amostra controle (veículo: etanol), B-amostra tratada com 0,5nM vitamina D, C-amostra tratada com 100nM vitamina D.

Adotamos um outro algoritmo para normalização e análise dos dados, o *Robust Multichip Averaging* (RMA), o qual baseia-se no PM e outras técnicas para correção do ruído de fundo (background), e portanto, determinação dos níveis de expressão que será descrito logo a seguir.

4.8.2.3. Normalização e análise dos *Chips* de *cDNA microarray*

O algoritmo utilizado para normalização foi o *Robust Multichip Averaging* (RMA), introduzido por Irizarry et al. (2003) e Rafael et al (2003), e disponibilizado pelo *Software GeneSpring GX* (www.agilent.com). Este algoritmo executa a correção do ruído de fundo (*background correction*), a normalização dos dados e a *probe summarization* para converter os níveis de intensidade dos *probes* em valores de expressão de genes. Para tanto ele utiliza arquivos **.cel**, ou seja, arquivos sem nenhuma correção prévia.

Correção do ruído de fundo baseia-se nos pares de nucleotídeos designados *PM*, isto é, considera somente a hibridização realizada nas *PM* para correção do ruído de fundo. Para tanto, a observação chave dá-se pela distribuição dos valores da intensidade de hibridização em escala logarítmica ($\log(PM)$) em seu histograma. Neste histograma a distribuição da intensidade à esquerda da moda apresenta-se similar à distribuição da curva normal. Entretanto, esta curva se prolonga muito mais à direita, sugerindo que a hibridização das *PM* à direita está relacionada com hibridizações não específicas e ruído de fundo, o que não ocorre ao lado oposto da curva. Sendo assim, o pico do histograma seria a estimativa da média do ruído de fundo o qual pode ser subtraído de todos os valores da intensidade das *PM* para correção do ruído de fundo.

A normalização utilizada é a *quantile* a qual se utiliza da intensidade bruta de todas as lâminas para construir a intensidade média de todos os probes (Bolstad et al;2003). Enfim, este assume que todas as lâminas possuem uma distribuição idêntica de sua intensidade independente de sua variância. E a probe summarization utiliza a *Median Polish* de Tukey para seguir o modelo linear nos dados já corrigidos e normalizados convertidos para o log de base 2 a fim de estimar o real valor da expressão dos genes.

4.9 Reação de Transcriptase Reversa (RT) para obtenção de cDNA

A síntese da fita de cDNA foi realizada a partir de 4µg de RNA total diluídos em 10µl de água DEPC e ao qual foram acrescentados 2µl de oligonucleotídeos hexâmeros iniciadores (0,5 µg/µl) (Amersham Biosciences, Inglaterra). A mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos para romper qualquer estrutura secundária que poderia ser formada e, posteriormente foi colocada imediatamente no gelo por 2 minutos. Será adicionado 4µl de tampão da *SuperScript III* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) (Invitrogen, EUA), 2µl de mistura de nucleotídios (dNTPs) a 2,5 mM, 1µl de ditioneitol (DTT) a 0,1M (Invitrogen, EUA) os quais agem na desnaturação da cadeia molde. Incubou-se por 10 minutos a 55°C e colocou-se 1µl da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (200U/µl) (Invitrogen, EUA), incubando-se por 60 minutos. Ao final elevou-se a temperatura a 70°C por 15 minutos, estocando a -20°C até o uso. Para as amostras oriundas de linhagens celulares, HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7, tratadas ou não com vitamina D, a síntese de cDNA foi realizada em triplicada.

4.10 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR)

A PCR em tempo real avalia o acúmulo do produto DNA dupla fita na fase logarítmica da reação de amplificação, o qual está diretamente relacionado à quantidade de molde (cDNA) existente no início da reação.

Utilizamos o sistema de detecção por *SYBR Green I*, que se baseia no uso de uma molécula fluorescente que, quando intercalada à dupla fita da DNA, emite fluorescência, sendo então possível quantificar o total de moléculas de DNA produzidas.

Neste método de detecção, a confirmação de especificidade da amplificação é realizada por meio da análise da curva de desnaturação. Nesta curva, analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de desnaturação T_m de cada fragmento, resultante da reação de amplificação. Cada fragmento amplificado possui uma T_m específica, o que permite a diferenciação entre os produtos resultantes.

Durante a reação, a fluorescência aumenta a cada novo ciclo de polimerização 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, obrigatoriamente, deve estar na fase exponencial da reação de PCR. O ciclo exato no qual o limiar de fluorescência é definido denomina-se ciclo limiar (*Ct: threshold cycle*). Amostras mais concentrada (com maior número de fitas molde iniciais) atingem o limiar mais precocemente e exibem valores de *Ct* mais baixos.

Avaliamos por qRT-PCR o nível de expressão do gene que realiza o catabolismo da vitamina D (gene-alvo), 24-hidroxilase (CYP24A1) e também do receptor de vitamina D (VDR) nas fatias de tecido e linhagens celulares tratadas com 0.5nM e 100nM de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ou veículo (etanol) por 24 horas, bem como em alguns genes induzidos pelo tratamento com vitamina D (Tabela 4) encontrados por técnica de *cDNA microarray* (descritos em “Genes Seleccionados”).

Todos os oligonucleotídeo iniciadores descritos (Tabela 4) foram desenhados pelo programa *Primer 3* ([www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3 www.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi)), após a escolha da seqüência do mRNA alvo contidos no site (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide). A região 3' do mRNA foi priorizada para confecção dos oligonucleotídeos, bem como a presença de grandes introns entre os éxons de interesse contidos no DNA do gene. Por fim, a sequência foi avaliada quanto a similaridade do gene de interesse em relação a outros genes (inespecificidade) no site *NCBI* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para as reações com as fatias de tecido tumoral mamário foram utilizados 5µL de cDNA (60ng/µL), 12,5µL de uma mistura (2x concentrada) contendo DNA Polimerase, MgCl_2 , dNTP, *Syber Green*, UDG e estabilizadores (*SYBER GreenER[®] qPCR SuperMix*, cat 11762-500, Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA), 0.75µL de cada oligonucleotídeo iniciador (direto e reverso) (10µM) e 1µL de água livre de RNases e DNases (cat 10977-023, Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA). Para as reações com as linhagens celulares HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 utilizamos 6µL de cDNA (20ng/µL), 10µL de uma mistura contendo DNA Polimerase, MgCl_2 , dNTP, *Syber Green* e *ROX*

(*ABsolute SYBR Green ROX mix*, cat. AB1162, Thermo Scientific, Surrey, Reino Unido), 0,6µL de cada oligonucleotídeo iniciador (direto e reverso) (10µM) e 2,8µL de água livre de RNases e DNases (cat 10977-023, Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA). O volume de ambas reações foi de 20µL. As reações de qPCR foram submetidas à 40 ciclos de repetição em condições adequadas de temperatura (95°C por 15 minutos iniciais e então 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto) em termociclador. Nas reações de fatias de tecido tumoral utilizamos o termociclador *Rotor-Gene 3000* (Corbett Research, Sydney, Austrália), enquanto nas reações com linhagens celulares utilizamos o ABI PRISM 7900HT (ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System, Applied Biosystems Inc, CA, EUA) contido no laboratório da professora JoEllen Welsh, Department of Biomedical Sciences, University at Albany. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

Tabela 4. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores dos transcritos dos genes alvo e tamanho do produto.

Símbolo do Gene	Número de Acesso do Banco de Genes	Seqüência dos Oligonucleotídeos Iniciadores	Tamanho do Produto	Temperatura de Anelamento
GAPDH*	NM_002046	Direto 5' ATTCCACCCATGGCAAATTC 3' Reverso 5' TGATGGGATTTCATTGATGA 3'	72pb	58 - 60°C
VDR	NM_002046	Direto 5' AGATTGGAGAAGCTGGACGA 3' Reverso 5' GCCCACCATAAGACCTACGA 3'	203pb	59 - 60°C
CYP24A1	NM_000181	Direto 5' TATTTGCGGACAATCCAACA 3' Reverso 5' GGCAACAGTTCTGGGTGAAT 3'	249pb	59 - 60°C
IL33	NM_033439.2	Direto 5' ATGCCAACAACAAGGAACACT 3' Reverso 5' TGAAACACAGTTGGAGTGCAT 3'	104pb	59 - 60°C
BMP6	NM_001718.4	Direto 5' AAGGGCTATGCTGCCAATTA 3' Reverso 5' CTCGGGGTTCATAAGGTGAA 3'	114pb	59 - 60°C
CD14	NM_000591.2	Direto 5' GCTCAGAGGTTCTGGAAGACT 3' Reverso 5' ATCGTCCAGCTCACAAGGTT 3'	115pb	59 - 60°C
IL1RL1	NM_003856.2	Direto 5' CTCATGTATTCCACAGCAGCA 3' Reverso 5' CCAATCCACGGTGTAACTAGG 3'	111pb	59 - 60°C
DPP4	NM_001935.3	Direto 5' GGTGATGTTGGAGTGGATT 3' Reverso 5' TATGTTGGTGTGCTGTGCTG 3'	83pb	59 - 60°C
CA2	NM_000067.2	Direto 5' TCTGGAATGTGTGACCTGGA 3' Reverso 5' TGTCCACCATCAGTTCTTCG 3'	122pb	59 - 60°C
SHE	NM_001010846.1	Direto 5' GCAGGTAATCCATTGCCCTA 3' Reverso 5' TCAGGGATGCTGTCAAACAC 3'	118pb	59 - 60°C

Legenda: * gene normalizador; pb= pares de bases.

A análise da expressão gênica utilizada em nosso estudo representou uma quantificação relativa dos genes de interesse, uma vez que requer um controle endógeno (gene normalizador), no caso o GAPDH, bem como o uso de uma amostra referência (média das amostras controle). Sendo assim, a média dos valores de ciclos limiares de cada amostra (Ct), variação entre as duplicatas menor que 1 ciclo limiar, foram utilizadas para quantificação da expressão dos genes de interesse, segundo o modelo matemático $2^{-\Delta\Delta Ct}$

A qualidade das reações e obtenção de cada Ct nas amostras oriundas de secção de tecido tumoral foram obtidas pelo programa *Rotor-Gene 6*

System (Corbett Research, Mortlake, Sydney, Austrália), enquanto, aquelas oriundas de linhagens celulares foram obtidas pelo programa *Sequence Detection System 2.2* (Applied Biosystems Inc, CA, EUA). A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad InStat, versão 3.06.

4.11 Análise Estatística

A obtenção dos genes diferencialmente expressos foi primeiramente baseada na remoção do percentil de 30% dos genes menos expressos cujo sinal não fora normalizado. As amostras foram agrupadas de acordo com a presença do veículo da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, o etanol (controle), e o tratamento de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 0.5nM e 100nM, realizado.

O teste *Repeated Measures ANOVA* ($p < 0.05$) foi utilizado para selecionar os genes diferencialmente expressos em relação às amostras controle, os quais deveriam estar presentes em pelo menos 1 das 3 condições (100nM vs controle; 0.5nM vs controle e 100nM vs 0.5nM). Uma variação de expressão (*fold*) de 2.0 também foi observada. Os genes selecionados para posterior análise foram aqueles cuja regulação foi positiva, ou seja, foram induzidos pelo tratamento com vitamina D em todas as condições (3 grupos citados) e apresentaram uma indução da expressão maior que 2.

O programa utilizado para normalização dos dados bem como para a análise estatística foi o *GeneSpring GX 10* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

5. Resultados

5.1. Amostras de câncer de mama se mantêm viáveis em cultura organotípica

Nosso sistema de cultura foi capaz de manter a viabilidade das fatias de tumor primário pelo tempo desejado, no caso, por 24 horas.

Figura 10. Avaliação da proliferação em fatia de tecido tumoral mamário. Após incubação com bromodeoxiuridina (10ug/ml) em placas sem e com inserto (membrana porosa), as fatias foram embebidas em tampão PBS, fixadas (paraformaldeído 4%), seguida de reação imunocitoquímica com anticorpo anti-bromodeoxiuridina (anti-BrDu) como descrito em métodos. A. Incorporação nuclear de bromodeoxiuridina; B. marcação nuclear com DAPI do mesmo campo de A e C combinação das duas imagens. Estas mesmas foram analisadas em microscópio de fluorescência NIKON Eclipse E600 (Japão) e as imagens capturadas e digitalizadas pelo programa Eclipse Net versão 1.16.3. Aumento 20x.

Avaliamos o índice de proliferação de secção de tecido tumoral em duas condições de cultivo: na primeira o tecido tumoral estava totalmente imerso no meio de cultura e na segunda a secção de tecido foi posicionada em cima de um inserto (Transwell Costar Cat. 34143), isto é, membrana com poros de 3.0 μm , que permite a passagem do meio de cultura para a secção tumoral posicionada no limiar da superfície do meio de cultura. Após a adição de BrDU ao meio de cultura, a revelação deu-se após adição de anti-BrDU conjugado ao fluorocromo em análise. A quantificação da incorporação foi realizada com o auxílio do programa *ImageJ*, disponível no endereço (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Foi possível notar que não houve diferenças significativas no índice de proliferação nas duas condições de cultivo que foi $18.89\% \pm 11.3$ em tecido imerso no meio e $10.44\% \pm 4.21$ em tecido colocado no inserto (Figura 10 e Tabela 5).

Tabela 5. Índice de proliferação em secção de tecido tumoral cultivado de maneira totalmente imersa ou em membrana porosa (*Teste t de Student* para amostras independentes).

Amostras	Número de secções analisadas	Média	Desvio Padrão	Significância (P<0,05)
Imerso	7	18.89%	11.31%	0.108
Inserto	5	10.44%	4.21%	

As amostras teciduais mantêm suas características morfológicas após cultura organotípica por 24 horas, tanto no período que segue a secção do tecido tumoral, após sua chegada ao laboratório (amostra no período zero hora de cultivo) como após 24 horas de cultivo como podemos observar na figura 11.

Figura 11. Fatia de tecido mantém características morfológicas após cultura primária e tratamento com vitamina D. As amostras foram emblocadas em parafina e coradas com HE. À esquerda amostras correspondentes a zero hora e à direita amostras tumorais após 24 horas de cultivo na presença ou não de tratamento com 100nM de vitamina D. Aumento 20x.

5.2. Câncer de mama expressa VDR e calcitriol induz a expressão de CYP24 em cultura organotípica de câncer de mama

Como nosso objetivo era determinar a ação do calcitriol em amostras de câncer de mama, determinamos, inicialmente, a expressão do receptor, mediador da ação hormonal e de CYP24A1, gene diretamente induzido como marcador de atividade.

Em amostras de câncer de mama que tiveram o perfil transcricional analisado pelo *chip de cDNA microarray*, a expressão de VDR foi avaliada sob a forma de três diferentes transcritos (*probe sets*) (Figura 12). VDR mostrou-se presente nos cinco tumores não tratados e não apresentou variação após o tratamento com 0.5nM ou 100nM de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Segundo dados oriundos do *microarray*, o gene alvo da vitamina D, a 24-hidroxilase, sofreu aumento de sua expressão após tratamento de fatia de tecido mamário com calcitriol (VD) em concentração fisiológica (0,5nM), farmacológica (100nM) em relação ao controle (veículo composto por etanol, ETOH) por 24 horas de cultivo. Este aumento foi representativo entre o controle e a concentração fisiológica (13), e mais acentuado entre o controle e a concentração farmacológica (130). Já entre a concentração fisiológica e farmacológica, o nível de indução foi 10 vezes como demonstrado pelas figuras 13 e 14.

Figura 12. Expressão do gene VDR em amostras de câncer de mama tratadas ou não com calcitriol. As três representações (*probe sets*) do transcrito do gene VDR, A, B e C variam de acordo com a poliadenilação e *splicing* alternativos. No eixo y temos representados os valores de intensidade normalizados, enquanto no eixo x estão as amostras controle (6A, 11A, 12A, 13A, 15A), amostras tratadas com 0,5nM de vitamina D (6B, 11B, 12B, 13B, 15B) e amostras tratadas com 100nM de vitamina D (6C, 11C, 12C, 13C, 15C) por 24 horas de cultivo.

Figura 13. Expressão de CYP24A1 em amostras de câncer de mama tratadas ou não com calcitriol. No eixo y temos representados os valores de intensidade normalizados, enquanto no eixo x estão as amostras controle (A), tratadas com 0,5nM de VD (B) e tratadas com 100nM de VD (C). Os círculos coloridos representam as amostras oriundas das pacientes 6 (azul), 11 (verde), 12 (marrom), 13 (vermelho), 15 (laranja).

Figura 14. Indução do gene alvo da ação da vitamina D, CYP24A1, entre amostras tratadas com 0.5nM e 100nM de vitamina D e veículo (etanol) avaliada por técnica de *cDNA microarray*. Análise por *Repeated Measures Anova*; $p > 0.05$ (GeneSpring GX 10).

Estes dados foram a seguir analisados em um grupo maior de amostras de câncer de mama os quais foram processadas da mesma maneira, isto é, por cultura organotípica e tratadas ou não com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Neste caso, a expressão de VDR e CYP24A1 foi determinada por qPCR. Corroborando com os achados encontrados, temos que a análise do novo grupo composto por 16 amostras também demonstrou a expressão semelhante do receptor da vitamina D (Figura 15) e nos confirmou a indução de CYP24A1 de forma acentuada na concentração de 0.5nM (42) e ainda mais exacerbada na concentração de 100nM (117) como demonstrado na figura 16.

Figura 15. Expressão do gene VDR por qPCR em outro grupo de amostras de câncer de mama tratadas ou não com calcitriol (teste Kruskal-Wallis; $p < 0.05$). Barras representam médias e erro padrão; $n=16$.

Figura 16. Expressão média do gene alvo, CYP24A1, por qPCR em outro grupo de amostras de câncer de mama tratadas ou não com calcitriol (teste Kruskal-Wallis; $p < 0.05$). Barras representam médias e erro padrão; $n = 16$.

Diante do exposto, conclui-se que tanto o tratamento com concentração de 0.5nM como o tratamento com concentração de 100nM foram capazes de induzir a expressão do gene alvo, CYP24A1. Isto sugere que mesmo concentrações baixas, passíveis de serem obtidas no organismo apresentam o potencial de promover as ações da vitamina D.

5.3 Genes diferencialmente expressos entre secção de tecido mamário tumoral tratado com vitamina D ou veículo (etanol)

Nosso objetivo principal foi determinar quais genes são regulados pelo calcitriol em amostras de câncer de mama.

O *Principal Component Analysis* (PCA), método de redução da variável que se utiliza de vetores alinhados com a direção da máxima variância para mostrar toda a variação existente na amostra, mostrou que as amostras de uma mesma paciente agrupam-se conjuntamente de acordo com a variabilidade biológica (Figura 17).

O efeito do tratamento da forma ativa da vitamina D, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, nas secções de tecido em relação ao controle nos revelou que 5,6% dos genes (2.649) (*probe sets*) estavam diferencialmente expressos dentre 44.351 genes (*Repeated Measures Anova*; $p < 0.05$). Os genes diferencialmente expressos agruparam todas as amostras pareadas lado a lado, resultando no dendograma da figura 18, assim, esta análise de agrupamento hierárquico nos mostra que o tratamento de três amostras com concentrações mais baixas, próximas às fisiológicas, induz menos variação na expressão gênica e a amostra tem uma maior similaridade com a amostra controle, isto é, tratada com o diluente da vitamina D, etanol.

Figura 17. Estimativa da variância da expressão gênica entre os tumores. As cores azul, verde, vermelho, cinza e marrom, correspondem, respectivamente, às amostras 12, 6, 11, 15 e 13. Cada tumor está representado por 3 círculos que correspondem às amostras controle e tratada com 0.5 e 100nM. Quanto mais próximo entre si, menor a variância da expressão gênica.

Figura 18. Agrupamento hierárquico baseado na distância euclidiana dos tumores segundo a expressão gênica. A expressão diferencial está representada em uma matriz: cada linha representa um único gene e cada coluna uma amostra. A abundância dos transcritos é representada pela cor da célula correspondente na matriz. A barra de cores representa a variação da expressão: verde indica uma menor expressão enquanto vermelho indica uma maior expressão. O dendograma no ápice da figura representa a similaridades no padrão de expressão entre as amostras experimentais.

Determinamos, então, em quais vias estavam os genes diferencialmente expressos utilizando o programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (<http://www.ingenuity.com/>) e observamos que as vias mais significativas, dadas por uma razão elevada e um valor de p reduzido, foram basicamente àquelas associadas com VDR (Figura 19). Por exemplo, a via das proteínas de fase aguda comumente induzidas em processos inflamatórios e neoplasias malignas, a via do receptor de ácido retinóico (RXR) que participa da heterodimerização com o VDR, a via do citocromo P450 cujas enzimas participam da síntese do colesterol e de hormônios esteróides, bem como da própria vitamina D, além das vias relacionadas ao ciclo celular.

Figura 19. Vias contendo os genes diferencialmente expressos em secção de tecido tumoral tratadas com VD. A razão (*ratio*) demonstrada no diagrama fornece uma visualização da porcentagem de genes pertencentes a uma via específica que estão também em dados de nossas amostras. Seu cálculo está baseado no número de moléculas de uma dada via que compreendem o critério de inclusão (*cutoff*) dividido pelo total de moléculas que fazem parte desta dada via. A razão fornece a associação entre um dado gene e a via a que ele pertence. *P-value*, nível de significância.

Partimos então para determinação de quais genes sofrem uma influência mais importante da ação da vitamina D, representado por maior da variação de expressão entre os grupos estudados (100nM vs controle; 0.5nM vs controle e 100nM vs 0.5nM). Assim uma subseleção de 394 genes com variação de expressão de 1.5 foi obtida. Dentre eles, os genes diferencialmente expressos entre a concentração de 0.5nM de vitamina D e o controle estavam envolvidos em processos biológicos como comunicação celular, resposta imune, processos metabólicos e morte celular, segundo sua classificação ontológica (GO) para processos biológicos, nível 3 ("FatiGO") (Tabela 6, em anexos)

Obtivemos indução da expressão de 62 genes (*probe sets*) (Tabela 7 em anexos) com uma diferença de expressão (*fold*) maior ou igual a dois em pelo menos 1 dos 3 grupos. Notadamente o tratamento com 100nM de vitamina D remete a uma maior diferença de expressão como demonstrado no dendograma abaixo (Figura 20).

Figura 20. Agrupamento hierárquico baseado na distância euclidiana da expressão gênica entre os grupos controle, tratamento fisiológico (0.5nM calcitriol) e tratamento farmacológico (100nM calcitriol) das secções de tecido tumoral . A barra de cores representa a variação da expressão: verde indica uma menor expressão enquanto vermelho indica uma maior expressão.

Dentre eles podemos destacar os genes: CD14, dipeptil peptidase 4 (DPP4) e anidrase carbônica 2 (CA2) cujo aumento de expressão foi de 1.5 vezes em relação à concentração fisiológica e maior que 2 em relação à farmacológica. Receptor similar ao receptor de interleucina 1 (IL1RL1) e SH2 contendo a proteína E (SHE) cuja expressão entre as amostras controle e o tratamento com 100nM VD tiveram variação maior que 2.5 vezes, enquanto a expressão entre o controle e o tratamento com 0.5nM foi de 1,4 e 1,3, respectivamente. Já os genes proteína óssea morfogenética 6 (BMP6) e interleucina 33 (IL33) apresentaram variação maior que 2.0 entre os tratamentos (farmacológico em relação ao fisiológico).

Os critérios para seleção dos genes candidatos a validação (Figura 21) foram a concordância da regulação entre os grupos estudados e uma diferença de expressão de pelo menos 2.0 vezes em pelo menos um dos grupos.

Figura 21. Expressão dos genes candidatos CD14, DPP4, CA2, SHE, IL1RL1 e IL33 em amostras de câncer de mama tratadas ou não com calcitriol. No eixo y temos representados os valores de intensidade normalizados, enquanto no eixo x estão as amostras controle (6A, 11A, 12A, 13A, 15A), amostras tratadas com 0,5nM de vitamina D (6B, 11B, 12B, 13B, 15B) e amostras tratadas com 100nM de vitamina D (6C, 11C, 12C, 13C, 15C) por 24 horas de cultivo.

5.4 Expressão de genes candidatos em novo grupo de amostras de câncer de mama

A seguir reavaliamos a expressão dos genes candidatos (CYP24A1, DPP4, CA2, CD14, IL1RL1, BMP6, IL33 e SHE) no mesmo grupo de amostras utilizando uma outra técnica, a qPCR e verificamos se houve correlação entre os valores de expressão relativa, obtidos através de qPCR e *cDNA microarray*.

Tabela 8. Correlação entre valores de expressão relativa dos genes avaliados por *cDNA microarray* e qPCR.

Genes candidatos	N	Correlação (microarray vs qPCR)	
		r	P
CD14	15	0.682	0.005 ^α
DPP4	14	0.952	0.000 ^β
BMP6	15	0.029	0.919 ^β
CYP24	15	0.907	0.000 ^β
IL1RL1	15	0.807	0.000 ^β
CA2	15	0.954	0.000 ^β
IL33	15	0.900	0.000 ^β
SHE	15	0.804	0.000 ^β

Legenda: r = coeficiente de correlação; α-Correlação de Pearson (paramétrica); β-Correlação de Spearman (não-paramétrica). A distribuição dos valores de expressão gênica em relação à normalidade foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os valores obtidos pelas duas técnicas de quantificação de RNA mensageiro apresentam coeficiente de correlação significativamente positivo para os genes CD14 ($p=0.005$), DPP4 ($p=0.0001$), CYP24 ($p=0.0001$), IL1RL1 ($p=0.0001$), CA2 ($p=0.0001$), IL33 ($p=0.0001$) e SHE ($p=0.0001$). Já o gene BMP6 apresentou uma correlação positiva não significativa ($p=0.919$) (Tabela 8).

Analizamos também a expressão dos genes selecionados em um segundo grupo de amostras proveniente de outras pacientes também pós-menopausadas. Os dados clínicos das pacientes foram comparados entre o grupo de validação técnica e biológica, de maneira a verificar a homogeneidade entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9. Comparação entre os dados clínicos das pacientes dos grupos de validação técnica e biológica (Teste Exato de Fisher).

<i>Características</i>	<i>Validação técnica</i>	<i>Validação biológica</i>	<i>P</i>
Idade média (anos)	66.6	59.8	0.106*
EC III	60.0 % (3/5)	31.2% (5/16)	0.296
CDI	100.0% (5/5)	62.5% (10/16)	0.028
RE+	60.0% (3/5)	62.5% (10/16)	0.262
RP+	80.0% (4/5)	50.0% (8/16)	0.647
HER2+	20.0% (1/5)	37.5% (6/16)	0.557
LN+	60.0% (3/5)	56.2% % (9/16)	0.704

Legenda: CDI-carcinoma ductal invasor, EC- Estadiamento clínico; LN- Comprometimento de linfonodos, Receptor de Estrógeno (RE), Progesterona (RP), Expressão de ErbB2. *Teste t não pareado.

A expressão relativa para os genes CA2, CD14 e DPP4 foi respectivamente: controle (1.3;1.5;1.4), concentração de 0.5nM (2;1.9;2.6) e concentração de 100nM (3.1;5.4;3.2) e estão representadas nos gráficos abaixo (figura 22). A figura 23 mostra que os genes SHE, BMP6 e IL1RL1 apresentaram indução não significativa após o tratamento com calcitriol, enquanto o gene IL33 não sofreu modulação.

Figura 22. Expressão dos genes CA2, CD14 e DPP4 (por qPCR) em amostras de câncer de mama tratadas ou não com calcitriol. Teste de *Friedman* (p dentro da figura) e teste de múltiplas comparações de *Dunn* ($p < 0.001$, a x c, g x i; $p < 0.01$, a x b, g x h; $p < 0.05$, d x f). $n = 16$.

Figura 23. Expressão dos genes SHE, BMP6, IL1RL1 e IL33 (por qPCR) em amostras de câncer de mama tratadas ou não com calcitriol. Teste de Friedman (p dentro da figura). $n=16$.

5.5 Células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 expressam VDR, e calcitriol induz a expressão de CYP24A1

A vitamina D pode apresentar efeito quimioprolifático em células mamárias normais que sofreram processo de iniciação a carcinogênese, portanto, avaliamos o papel da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na regulação da expressão dos genes selecionados no modelo de células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 que representam desde células mamárias normais imortalizadas até células tumorigênicas.

Células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 foram cultivadas por 24 horas na presença de veículo, 0.5nM ou 100nM de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. A expressão do gene VDR, fator importante que medeia a ação da vitamina D, foi similar em todas as linhagens analisadas (figura 24). A sensibilidade ao tratamento com $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ foi confirmada pela indução do gene alvo da vitamina D, CYP24.

Figura 24. Indução do mRNA do receptor de vitamina D (VDR) em linhagens HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7. N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

Mais uma vez, entretanto agora utilizando tratamento em linhagens celulares, podemos notar na figura 25 que tanto o tratamento com concentração próximas a fisiológica como o tratamento com concentração farmacológica foram capazes de induzir a super-expressão do gene alvo da VD, CYP24A1. Isto sugere que mesmo concentrações relativamente baixas, passíveis de serem obtidas no organismo apresentam o potencial de promover as ações da vitamina D.

A linhagem celular MCF7 foi a mais sensível ao tratamento, em conformidade com os dados da literatura, apresentando uma indução de 0,98 no controle, 21,56 no tratamento fisiológico e 6.122,00 no tratamento farmacológico. Contudo, também obtivemos uma indução significativa deste gene alvo nas linhagens HME e HME^{LT}, e ainda, nas células HME^{PR} embora num nível menor. Relatou-se em estudo prévio (Kemmis et al, 2008) que esta última linhagem apresentou cerca de 70% de redução nos níveis protéicos de VDR após estabilidade da transfecção com antígeno T do SV40 e o oncogene H-Ras. Nos dados obtidos pela técnica de *cDNA microarray* entre as amostras de pacientes, a indução de CYP24A1 entre o grupo controle e o grupo correspondente à concentração fisiológica foi de 13 vezes, já entre o controle e o grupo tratado com concentração de 100nM, o nível de indução foi de 130 vezes, entre a concentração fisiológica e farmacológica, o valor de indução foi de 10 vezes, conforme descrito anteriormente.

Figura 25. Indução do gene alvo da ação da vitamina D, CYP24 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 em amostras tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. ** p< 0.01 entre o controle x tratamento de 0.5nM; *** p<0.001 entre o controle e o tratamento de 100nM e também entre o tratamento de 0.5nM e 100nM. N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

5.6 .Modulação da expressão de genes candidatos em célula mamária normal e na carcinogênese mamária

A análise da expressssão do RNAm de sete genes canditados, DPP4, SHE, CA2, IL1RL1, IL33, CD14,CYP24, genes super-expressos em cultura organotípica de tumor mamário obtidos por técnica de *cDNA microarray*, foi avaliada por qPCR em um modelo de transformação mamária (linhagens HME, HME^{LT}, HME^{PR}) até células cancerosas propriamente dita, representada pela linhagem MCF7.

5.6.1 Indução da expressão de DPP4 por vitamina D durante a carcinogênese mamária

Observamos que a VD em alta concentração (100nM) induz de moderadamente a expressão de DPP4 em células epiteliais mamárias normais HME (4,3 vezes) e no modelo de progressão, HME^{LT} e HME^{PR} (9 e 2,5 vezes, respectivamente), mas que concentração relativamente baixa de VD (0,5 nM) causa somente um discreto aumento em células HME^{LT} e HME^{PR} (1,4 - 1,7 vezes). Por outro lado, em células de câncer de mama MCF7, a expressão de DPP4 não é regulada pela vitamina D (Figura 26).

Figura 26. Indução do gene DPP4 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 em amostras tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. Teste de Kruskal Wallis (p dentro da figura); Teste de múltiplas comparações de Dunn ($p < 0.01$ a x c; b x c ; d x f; e x f; g x h; g x i; $p < 0.05$ d x e; h x i). N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

5.6.2 Indução da expressão de CA2 por vitamina D durante a carcinogênese mamária

A expressão de CA2 é induzida com intensidade semelhante em células HME e HME^{LT} (cerca de 4 vezes) após tratamento com VD 100nM e induzida de forma discreta em células HME^{PR} expostas a VD 0,5 ou 100 nM (cerca de 1,5 vezes). Em células MCF 7, o tratamento não influencia a expressão deste gene (Figura 27).

Figura 27. Expressão do gene CA2 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. Teste de Kruskal Wallis (p dentro da figura); Teste de múltiplas comparações de Dunn (p < 0.001 a x c; b x c; d x f, e x f, g x h, g x i). N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

5.6.3 Indução da expressão de IL33 por vitamina D durante a carcinogênese mamária

A expressão de IL33 parece regulada de modo similar a CA2. Em células HME e HME^{LT} expostas a VD 100nM ocorre indução da expressão de IL33 semelhante (cerca de 3 vezes), indução moderada em células HME^{PR} expostas a VD 0,5 e 100nM (2-2,7 vezes) e ausência de regulação em células MCF7 (Figura 28).

Figura 28. Indução do gene IL33 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 em amostras tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. Teste de Kruskal Wallis (p dentro da figura); Teste de múltiplas comparações de Dunn (p < 0.01 a x c, b x c, d x f, e x f, g x h, g x i). N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

5.6.4 Indução da expressão de IL1RL1 por vitamina D durante a carcinogênese mamária

Em células HME, HME^{LT} e HME^{PR}, o tratamento com VD 100nM induz fortemente a expressão de IL1RL1 (13,4 a 77 vezes) e o tratamento com VD 0,5 nM induz de forma moderada (2,3 – 3,1 vezes). Em células MCF7, ocorre modulação positiva discreta de IL1RL1 após tratamento com VD 100nM (2 vezes) (Figura 29).

Figura 29. Expressão do gene IL1RL1 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. Teste de Kruskal Wallis (p dentro da figura); Teste de múltiplas comparações de Dunn (p < 0.05 a x b, j x l; p < 0.01 a x c, b x c, d x e, d x f, e x f, g x h, g x i, h x i). N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

5.6.5 Indução da expressão de BMP6 por vitamina D durante a carcinogênese mamária

A expressão de BMP6 é fortemente induzida em células HME (62 vezes) bem como em células HME^{LT} e HME^{PR} (aumento de 20 a 60 vezes) tratadas com VD 100 nM. Indução não tão intensa ocorre em células HME^{LT} e HME^{PR} expostas a VD 0,5 nM (aumento de 1,7 e 5,1 vezes). A expressão de BMP6 em células MCF7 não se altera com o tratamento com VD (Figura 30).

Figura 30. Indução do gene BMP6 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 em amostras tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. Teste de Kruskal Wallis (p dentro da figura); Teste de múltiplas comparações de Dunn (p < 0.01 a x b, a x c, b x c, d x f, e x f, g x h, g x i, h x i). N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

5.6.6 Indução da expressão de CD14 por vitamina D durante a carcinogênese mamária

CD14 sofre regulação positiva muito acentuada pelo tratamento com VD 100nM em células HME e HME^{LT} (62-85 vezes) e indução um pouco menos intensa em células HME^{PR} e MCF7 (9,2 e 7,4 vezes). Além disso, células HME^{PR} apresentam indução discreta da expressão de CD14 após exposição a VD em concentração de 0,5 nM (1,7 vezes) (Figura 31).

Figura 31. Expressão do gene CD14 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. Teste de Kruskal Wallis (p dentro da figura); Teste de múltiplas comparações de Dunn (p < 0.05 g x h; p < 0.001 a x c, b x c, d x f, e x f, g x i, h x i). N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

5.6.7 Indução da expressão de SHE por vitamina D durante a carcinogênese mamária

A expressão de SHE é fortemente induzida pelo tratamento com VD 100 nM em todas as linhagens, HME, HME^{LT} e HME^{PR} (aumento de 61 a 241 vezes), inclusive MCF 7 (41 vezes). Ocorre também indução de SHE em células HME (1,7 vezes), HME^{PR} (aumento de 5,1 vezes) e MCF 7 (2 vezes) expostas a VD 0,5 nM (Figura 32).

Figura 32. Indução do gene SHE em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D. Teste de Kruskal Wallis (p dentro da figura); Teste de múltiplas comparações de Dunn (p < 0.001 a x c, b x c, d x f, e x f, g x h, g x i, h x i, j x l, k x l; p < 0.05 j x k). N=3, em triplicatas. Barras representam médias e erro padrão.

Analisando por outro ângulo, observamos que em geral VD 0,5 nM regula a expressão dos genes selecionados, isto é, induz a expressão de IL1RL1 (2,3 vezes) e SHE (1,7 vezes) em células mamárias normais HME; DPP4 (1,4 vezes), BMP6 (1,7 vezes), IL1RL1 (2,7 vezes) em células HME^{LT}; DPP4 (1,7 vezes), BMP6 (5,1 vezes), SHE (5,1 vezes), IL33 (2 vezes), IL1RL1 (3,1 vezes), CD14 (1,7 vezes) em células HME^{PR}, e SHE em células de câncer de mama MCF7 (2 vezes).

O tratamento com VD 100nM causa uma regulação positiva intensa em grande parte dos genes selecionados e em praticamente todas as linhagens mamárias do modelo de progressão como DPP4 (4,3 vezes), BMP6 (62 vezes), SHE (241 vezes), CA2 (3,8 vezes), IL33 (2,8 vezes), IL1RL1 (77 vezes), CD14 (62 vezes) em células HME. Já nas células HME^{LT} os genes induzidos pelo tratamento com 100nM foram DPP4 (9 vezes), BMP6 (20 vezes), SHE (169 vezes), CA2 (4 vezes), IL33 (3,2 vezes), IL1RL1 (70 vezes) e CD14 (85 vezes). Nas linhagens HME^{PR} os genes regulados foram DPP4 (2,3 vezes), BMP6 (60 vezes), SHE (61 vezes), CA2 (1,5 vezes), IL33 (2,7 vezes), IL1LR1 (13,4 vezes), CD14 (9,2 vezes). Por fim, na linhagem de câncer de mama, MCF7, houve indução da expressão de SHE (41 vezes), IL1RL1 (2 vezes), CD14 (7,4 vezes).

5.7. Expressão protéica de VDR, CYP24A1, CA2 e CD14

A expressão positiva do receptor de vitamina D em células HME detectada por seu RNAm, também foi confirmada pela expressão da proteína (figura 33). Além disso, a sensibilidade ao tratamento com calcitriol por 48 horas pode ser visualizada pela expressão da proteína alvo CYP24A1 (Figura 34)

Figura 33. Expressão protéica de VDR em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo (C) e 100nM de vitamina D (VD) por 48 horas.

Figura 34. Expressão da proteína alvo CYP24A1 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo (C) e 100nM de vitamina D (VD) por 48 horas.

Avaliamos a expressão protéica de dois candidatos, CA2 e CD14 em amostras de células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7, pois ambos já se mostraram modulados pelo tratamento com a vitamina D em outros modelos celulares (Lee et, 2006).

Observamos que a expressão protéica de CA2 está ausente em todas as células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7, entretanto ocorre modulação positiva intensa em células mamárias normais HME e modulação positiva moderada em células HME^{LT}, que são imortalizadas mas não tumorigênicas. Esta indução da expressão de CA2 não ocorre em células tumorigênicas HME^{PR} e MCF7 (Figura 35).

Figura 35. Expressão protéica do gene CA2 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo (C) e 100nM de vitamina D (VD) por 48 horas. A coloração de ponceau aponta uma transferência protéica eficiente e uma quantidade equivalente de proteínas em cada linhagem estudada (figura 40 em anexos).

Analisando conjuntamente os resultados de expressão protéica e do transcrito de CA2, observamos que a regulação é em parte transcricional, pois em células HME e HME^{LT}, ocorre indução de 4 vezes na expressão do transcrito após tratamento com VD 100nM, e em parte pós transcricional, visto que a expressão protéica é diferente nestas células tratadas.

A expressão protéica de CD14 está presente em todas as células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7, e aparentemente não há variação induzida pelo tratamento com vitamina D 100 nM (Figura 36). Entretanto, CD14 pode ser secretada, e por esta razão, avaliamos a expressão da proteína no meio de cultura. Detectamos um aumento da presença da proteína CD14 no meio de cultura de células exposta à vitamina D, o que indica que esta induz a síntese e secreção de CD14 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR}, mas não em MCF7 (Figura 37).

Figura 36. Expressão protéica do gene CD14 em células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo (C) e 100nM de vitamina D (VD) por 48 horas. A coloração de ponceau apontou para uma transferência protéica eficiente e similar entre as linhagens estudadas (figura 41 em anexos).

Figura 37. Fração de CD14 secretada (sCD14) para o meio de cultura de células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo (c) e 100nM de 1,25(OH)₂D₃ por 24 horas.

5.8 Caracterização imunocitoquímica das proteínas CD14, DPP4 e VDR na transformação mamária

A expressão protéica dos genes VDR, CD14 e DPP4 foi pesquisada por imunofluorescência no mesmo período de tratamento da análise por qPCR, neste caso, considerando-se a concentração de 100nM.

Pode-se notar que há a distribuição dispersa muito discreta de CD14 pelo citoplasma da célula, os quais se tornam bem evidentes e presentes em todo citoplasma após o tratamento com calcitriol nas linhagens HME e HME^{LT}. Células HME^{PR} parecem não apresentar modificações após o tratamento (Figura 38). A correlação entre a expressão do RNAm e da proteína CD14 nos mostra que o aumento intenso (62-85 vezes) da expressão deste induzido também pela VD, corresponde ao aumento da proteína nas células HME e HME^{LT}, enquanto o aumento de 9,2 vezes encontrado no RNAm da linhagem HME^{PR} não foi suficiente para promover um aumento desta proteína, ou talvez, este aumento tenha sido muito sutil. Como a expressão protéica do lisato celular após tratamento por 48 horas mostrou-se semelhante em todas as linhagens é possível que modificações pós traducionais podem ter convertido a proteína de membrana em proteína solúvel, sCD14, encontrada aumentada no meio condicionado destas células após as 24 horas de tratamento.

Figura 38. Expressão protéica do gene CD14 em células HME, HME^{LT} e HME^{PR} tratadas com veículo e 100nM de vitamina D por 24 horas. Aumento 40x. Imagens visualizadas em microscópio confocal Leica TCS LSI (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

Pode-se notar que há a distribuição de pontos de coloração intensa correspondentes à proteína DPP4. Ela encontra-se dispersa por todo citoplasma das células e se tornam mais frequentes após o tratamento com 100nM de calcitriol por 24 horas como mostrado na figura 39. Não se sabe dizer se tal molécula está ancorada na membrana, se vai ser secretada ou se apenas distribui-se pelo citoplasma em regiões específicas.

Figura 39. Expressão protéica do gene DPP4 em células HME, HME^{LT} e HME^{PR} tratadas com veículo e 100nM de vitamina D por 24 horas. Aumento 40x. Imagens visualizadas em microscópio confocal Leica TCS LSI (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

6. Discussão

A cultura organotípica é um modelo interessante para se estudar a ação hormonal pois preserva a estrutura do tecido em relação à interação epitélio-estroma. Faz-se importante observar se há adequada difusão de oxigênio e nutrientes, o que foi indiretamente observado em nosso sistema através da preservação da morfologia tissular e taxa proliferativa. Estes achados indicam que a cultura organotípica de curtos períodos pode ser utilizada para investigar o comportamento tumoral *ex vivo*.

A ação genômica do tratamento da vitamina D é mediada pela heterodimerização do receptor da vitamina D (VDR) com o receptor de ácido retinóico (RXR) e às vezes, com o receptor retinóide A (RAR), que se ligam a elementos responsivos de vitamina D (VDRE) (Lips, 2006), advindo daí a importância de avaliar a expressão desse receptor entre as diferentes amostras. Observamos que o câncer de mama expressa VDR e não ocorre regulação da expressão do receptor mediante o tratamento do tumor com vitamina D.

Para avaliar a integridade da via, avaliamos a expressão do gene alvo do hormônio, CYP24A1, o qual normalmente apresenta baixa expressão basal, mas que é fortemente induzido pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ através de dois elementos de resposta (VDRE), localizados em sua região promotora proximal (Chen et al., 1995). Nossos resultados mostram que de CYP24A1 é baixa em amostras de câncer de mama, mas a via da vitamina D está preservada pois o tratamento do tumor tanto com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 0,5nM quanto com 100nM induz a expressão de CYP24A1. Em termos quantitativos esta regulação de CYP24A1 é diferente,

isto é, muito mais intensa com concentrações elevadas do hormônio, entretanto concentrações próximas à fisiológicas são passíveis de modularem a expressão de genes alvo. Estes dados foram observados tanto entre o grupo de amostras de pacientes analisadas pela técnica de *cDNA microarray*, quanto para o segundo grupo de amostras provenientes de outras 16 pacientes utilizadas para qPCR.

Analisamos o perfil gênico de 5 amostras de cultura organotípica tratadas com 0.5nM e 100nM de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ou com o veículo (controle). Observamos que o perfil transcricional pouco se altera com o tratamento, pois amostras da mesma paciente agrupam-se conjuntamente, como demonstrado pelo *Principal Component Analysis* (PCA), prevalecendo portando o perfil transcricional individual. Observamos que o tratamento com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 0,5nM, concentração que pode ser alcançada in vivo, modula a expressão de genes envolvidos em comunicação celular (ITGAM, IGFBP5, PECAM1, FN1), resposta imune (CD14, IL1RL1, IL18R1, CLU), processo metabólico celular (CA2, BMP6, USP10, TIMP1) e processo metabólico primário (DPP4, COM, FBP1). As interações gênicas existentes entre os genes regulados pelo tratamento com vitamina D, isto é, ativação de VDR/RXR (SERPINB1, SPP1, CYP24A1, IL1RL1, CD14, THBD), painel de citocromo P450 (CYP26B1, CYP24A1, CYP7B1), ativação FXR/RXR (ABCB4, IL1RN, FBP1, NR5A2), nos mostram vias relacionadas com a vitamina D. Outras vias indiretamente relacionadas foram: via de sinalização de $\text{NF}\kappa\text{B}$ (BMP2, TLR2, TLR4, LCK) e colestase hepática (CYP7B1, ABCB4, IL1RN, CD14, NR5A2).

Dentre os genes regulados pela vitamina D em amostras de câncer de mama, observamos a indução da expressão de CD14, DPP4, CA2, IL1RL1,

SHE, IL33 o qual foi modesta mediante exposição à vitamina D 0.5nM e mais intensa com exposição à VD 100nM. Reafirmando alguns de nossos achados, Lin et al (2002) em um estudo envolvendo cDNA microarray de linhagem de células escamosas tratadas com análogo da vitamina D, EB1089 (100nM), encontraram indução da expressão de BMP2, CD14, CA2 e FBP1.

Ao compararmos os resultados obtidos pelo *cDNA microarray* com PCR quantitativa verificamos correlação positiva significativa na expressão de 7 genes dentre os 8 genes avaliados (87.5%), isto é, CYP24A1, SHE, DPP4, CD14, CA2, IL1RL1 e IL33. O gene BMP6 apresentou uma correlação positiva, embora não significativa. Estes resultados mostram uma boa correspondência entre as duas técnicas utilizadas apesar de suas diferenças técnico-metodológicas, porque enquanto o *cDNA microarray* avalia milhares de transcritos às custas de uma sensibilidade menor e de um ensaio deveras complexo, desde sua manipulação até análise, o qPCR avalia a expressão de transcritos específicos em pequena escala com um procedimento mais simples. Chang et al (2003) obtiveram um coeficiente de correlação positivo para 13/15 genes (87%), sendo que 6 deles (40%) apresentavam correlação significativa. Em um outro estudo, Folgueira *et al.*, (2005) avaliaram o perfil de expressão gênica em cânceres de mama, utilizando também duas plataformas de cDNA microarrays diferentes e ao determinar por RT-PCR a expressão de alguns genes selecionados observaram correlação significativamente positiva de 50-62,5% entre os ensaios. 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).

Analizamos, agora por qPCR, mais 16 amostras de tumores mamários, seccionados em fatias e cultivados em meio de cultura contendo veículo (controle), 0.5nM e 100nM de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por 24 horas. Houve homogeneidade dos dados clínicos entre o grupo de validação técnica (amostras advindas da técnica de *cDNA microarray*, $n=5$) e o de validação biológica ($n=16$).

A vitamina D influencia o perfil de expressão gênica, entretanto, amostras de câncer de mama expostas a concentrações menos elevadas (0,5nM) apresentam um perfil transcricional mais próximo ao de tumores não tratados em relação a tumores expostos a altas concentrações (100nM), quando detectadas por qPCR. Observamos que os genes CA2, DPP4 e CD14 apresentaram modulação positiva significativa entre o grupo controle e o de 100nM, entretanto, não houve regulação significativa dos genes SHE, BMP6, IL1RL1 e IL33.

Utilizamos também um modelo de progressão de câncer (HME, HME^{LT} e HME^{PR}) e uma linhagem tumoral, MCF7, a fim de auxiliar a compreensão da ação da vitamina D em alguns genes candidatos durante a transformação. Nesta abordagem, determinamos se a vitamina D em concentrações de 0.5nM e 100nM modulam a expressão dos genes candidatos em modelo de progressão mamário.

Células HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 respondem ao tratamento com calcitriol em concentrações próximas à fisiológica. Em linhagem HME^{PR}, tumorigênica em camundongo imunossuprimido, ocorre modulação positiva de todos os genes candidatos mediante tratamento com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 0.5nM. Além disso, elevadas concentrações do hormônio (100nM) promovem uma indução

da expressão de DPP4, BMP6, SHE, CA2, IL33, IL1RL1 e CD14 que é acentuada em todas as células do modelo de progressão, isto é, HME, HME^{LT}, HME^{PR}. Lee et al (2006) também utilizaram um modelo de progressão mamária (MCF10AT, transfectada com Ha-ras, e MCF10CA1a1, totalmente maligna) para estudar a ação de um análogo da vitamina D (Ro3582, 1nM) por análise de *cDNA microarray*. De acordo com nossos dados, observaram indução da expressão de BMP6 e CD14. Ademais, estes autores relataram que a expressão significativa de maior número de genes ocorreu na linhagem pré-maligna.

Já a linhagem de câncer de mama, MCF7, não apresenta indução dos genes candidatos ao realizarmos tratamento com 0.5nM de VD. Por outro lado, o tratamento com 100nM promoveu aumento acentuado da expressão de genes SHE, IL1RL1 e CD14. Como essa célula tumoral foi cultivada isoladamente, sem a presença de tipos celulares oriundos do estroma, é possível que o estroma pouco ou não interfira na expressão destes genes.

Como tumores de mama em cultura organotípica apresentam indução dos genes DPP4, CA2, e IL1RL1 em concentrações de 0.5nM de VD, em oposição ao ocorrido na linhagem MCF7, isto nos sugere uma ação promovida pela interação epitélio-estroma. É possível que somente a presença de células oriundas do estroma modulam a expressão destes genes pela célula tumoral. Uma importante indução de CD14, DPP4, CA2, IL1RL1, SHE, IL33, em tumores após tratamento de 100nM foi encontrada, entretanto, o cultivo isolado de células normais e transformadas promoveu uma indução positiva ainda mais intensa. Mais uma vez o estroma presente em secção de tecido pode estar

atenuando a expressão destes genes, intensamente modulados na célula epitelial isolada.

A anidrase carbônica 2 (CA2) pertence a uma família de, pelo menos, sete enzimas cuja função é catalisar a hidrogenação reversível do dióxido de carbono, atuando no metabolismo ácido-básico Dodgson et al., 1991. O gene CA2 destacou-se por apresentar modulação positiva significativa entre o amostras controle e o tratadas com 0.5nM. O mecanismo pelo qual esta indução ocorre não foi totalmente elucidado. Apesar do gene CA2 não apresentar um VDRE conhecido em seu promotor, David et al (2001) relataram que seu promotor apresenta um sítio funcional de ligação a AP-1 e que o tratamento com 1,25 dihidroxivitamina induz a ligação de um complexo AP-1 composto por Fra-2 e JunD, que contribui para diferenciação de osteoclastos, mostrando uma indução indireta deste gene pela vitamina D. Laitala and Vaananen (1994) demonstraram que esta enzima é expressa em níveis elevados em osteoclastos durante a reabsorção óssea, o que sugere relação com os efeitos clássicos da vitamina D no metabolismo ósseo. Entretanto, esta associação não é clara, pois outro membro da família, CA12, teve sua expressão reduzida em células mamárias tratadas com VD (Lee et al, 2006).

A dipeptidil peptidase 4 (DPP4) é uma glicoproteína de membrana, expressa na maioria dos tipos celulares (Lambeir et al.,2001), com atividade serina protease e que também possui uma forma solúvel presente nos fluidos corpóreos (Havre et al.,2008). Frequentemente está desregulado no câncer, sendo hiporegulado ou perdido em alguns tumores e superexpresso em outros (Havre et al,2008; Sulda et al, 2006). Wesley et al. (1999) relataram que a reexpressão de DPP4, a qual é perdida durante a transformação de

melanócitos em melanomas, causa redução do crescimento tumoral. Além disso, a proteína solúvel de DPP4 aumenta a sensibilidade a morte em tumores linfóides tratados com doxorrubicina (Aytac et al., 2001). Logo, a indução da expressão de DPP4 pela vitamina D pode estar envolvida em seu efeito antiproliferativo. A indução de DPP4 pela vitamina D foi identificada em amostras analisadas por microarray e confirmada em um grupo maior de amostras. Além disso, sua expressão foi induzida em níveis transcricionais e protéicos no modelo de progressão mamária, indicando que este é um novo alvo da vitamina D.

CD14 é uma proteína de membrana tipicamente expressa em monócitos e macrófagos. O gene codifica 2 isoformas: uma correspondente a uma proteína de membrana e a outra a uma proteína solúvel. Em nosso trabalho, a indução da expressão de CD14 pelo tratamento com calcitriol foi detectada por técnica de cDNA microarray em cinco amostras e confirmada em grupo maior de amostras de cultura organotípica de câncer de mama. Da mesma forma, houve indução acentuada deste gene em modelo de progressão mamária HME, HME^{LT}, HME^{pr} e linhagem MCF7 após tratamento com 1,25(OH)₂D₃ 100nM. A expressão protéica também foi induzida mesmo após tratamento curto por 24 horas nas células HME e HME^{LT}.

O mecanismo de indução do gene CD14 não é claro, visto que não há VDRE conhecidos na região promotora deste gene. Entretanto, já é sabido que a 1,25(OH)₂D₃ regula a atividade do fator de transcrição Sp1 e que existem 4 sequências de ligação a Sp1-símile (Moeenrezakhanlou et al., 2008) no

promotor do gene. Portanto, a indução gênica promovida pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ parece ocorrer através de um mecanismo indireto.

CD14 e sCD14 são moléculas críticas para a transdução de sinal de lipopolissacárides (LPS) (LeVan et al, 2001). Uma outra atuação de CD14 associa-se à apoptose. Ao estudar a involução da glândula mamária, um processo que envolve remodelação do tecido e apoptose controlada, Stein et al (2004) observaram super expressão de LBP (proteína de ligação a lipopolissacárides) e CD14 dentre as proteínas de fase aguda, tanto ao nível transcricional quanto protéico. Devitt et al (1998) relataram que CD14 parece importante no reconhecimento e fagocitose de células apoptóticas.

SHE, domínio SH2 contendo a proteína E, constitui uma proteína do domínio de SH2, cujo RNAm foi encontrado em coração, pulmão, cérebro e músculo esquelético de tecido murino (Oda et al, 1997). Como o domínio SH2 pode estar presente em diferentes moléculas de modo a exercer diversos efeitos, é difícil prever se ocorre uma atuação oncogênica em SH2 e, conseqüentemente em SHE, como no oncogene Src. Oda et al (1997) revelaram que SHE poderia interagir com ambas quinases, normais e defeitosas, da proteína humana ABL1.

Em nosso estudo, SHE foi mais expressa em amostras de tumor tratados com vitamina D e, de acordo com nossos resultados, uma outra subunidade desta proteína, a SHB, também contida em SH2 foi encontrada superexpressa em células epiteliais mamárias após tratamento com análogo da VD (Lee et al, 2006).

Um outro gene induzido significativamente por VD em câncer de mama segundo dados de cDNA microarray, mas não de qPCR, foi BMP6. As proteínas ósseas morfogenéticas possuem habilidade de induzir osteogênese em osteoblastos humanos (Cheng et al, 2003). O tratamento com a vitamina D aumentou a expressão de BMP6 em células mamárias normais (Lee et al, 2006) e em fibroblastos dérmicos (Hee et al, 2009). Assim como a VD, estrógenos também estimulam a expressão de BMP6 (Rickard et al, 2008). De acordo com nossos dados, demonstrou-se que a VD induz a expressão de BMP6 em fibroblastos. Logo, nossos dados bem como de outros autores indicam que BMP6 é um gene alvo da vitamina D.

Por fim temos os genes IL1RL1, receptor similar ao receptor de interleucina 1, e seu ligante, a proteína codificada pelo gene IL33. A IL1RL1 é um membro da grande família de receptores de interleucina 1 o qual transcreve duas variantes de RNAm originando uma proteína transmembrana e outra solúvel. IL1RL1 é predominantemente expresso em linhagens hematopoiéticas e linfócitos T helper, atuando em processos de resposta imune e inflamatória (Brunner et al, 2004; Quigley et al, 2009; Yanagisawa et al, 1997).

A relação de ILRL1 com o câncer ainda não é bem estabelecida. Haga et al (2003) analisaram a expressão deste gene em linhagens de glioma humano e amostras de glioblastoma, mostrando que a expressão de IL1RL1 é menor nestas amostras em relação aos fibroblastos, TM12. Ainda neste mesmo estudo, a eficiência da formação de colônia em linhagens de glioblastoma foi reduzida após adição da forma solúvel de IL1RL1 em meio de cultura.

A relação entre IL1RL1 e vitamina D foi plenamente sedimentada, através de um estudo em que linhagem tumoral de células escamosas de cabeça e pescoço expressou IL1RL1 após tratamento com vitamina D e a busca de elementos conservados revelou a presença de VDRE neste gene (Wang et al, 2005). Em nosso estudo a superexpressão de IL1RL1 foi observada em amostras tumorais mamárias após tratamento com vitamina D.

O gene interleucina 33, IL33, é amplamente expresso em diversos tecidos ao nível celular, células de músculo liso, células epiteliais pulmonares (Schmitz et al., 2005) e adipócitos (Wood et al., 2009). Foi demonstrado que IL33 liga-se à proteína ST2 (IL1RL1), recrutando MYD88, IRAK, IRAK4, TRAF6 e levando a fosforilação de ERK1 (MAPK3), ERK2 (MAPK1), p38 (MAPK14) e JNK (Schmitz et al., 2005; Palmer et al., 2008). Xu et al. (2008) verificaram que IL33 induz a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias importantes em doenças articulares além de participar na ativação de fibroblastos, sugerindo que IL33 pode ser um alvo terapêutico para o tratamento da artrite reumatóide.

Em resumo, observamos que o modelo de cultura organotípica reproduz um modelo mais próximo a realidade tumoral, que atenta para as interações epitélio-estroma. Utilizando este modelo, avaliamos a influência da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (calcitriol) em concentração passível de ser obtida *in vivo*, no perfil de expressão gênica. Observamos que a via da vitamina D é ativa em amostras de câncer de mama e induz a expressão do gene alvo CYP24A1 e outros genes como CA2, DPP4 e CD14. Detectamos também que a vitamina D regula a expressão destes genes em linhagem mamária de progressão tumoral.

7. Conclusões

1. Cultura primária de secção de de câncer de mama mantém sua viabilidade por 24 horas.
2. A expressão de CYP24A1 é induzida por $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em concentração de 0,5nM e 100nM em amostras de câncer de mama, no modelo de progressão mamária HME, HME^{LT} e HME^{PR(LT+Ras)} e na linhagem tumoral, MCF7.
3. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regula a expressão de 5.6% dos transcritos avaliados, incluindo genes envolvidos em resposta imune (CD14, IL1RL1 e IL33) e processos metabólicos primários (CYP24A1, CA2, DPP4 e BMP6).
4. A expressão de CA2 é induzida por 0.5nM e 100nM de vitamina D em cultura organotípica de câncer de mama e a expressão de CD14 e DPP4 é indizida na concentração de 100nM.
5. Em modelo de progressão tumoral, HME, HME^{LT} e HME^{PR} responderam ao tratamento com calcitriol, modulando os genes DPP4, SHE, CA2, CD14, BMP6, IL1RL1 e IL33. Já a linhagem de câncer de mama, MCF7, apresentou indução dos genes SHE, IL1RL1 e CD14.

8. Anexos

Anexo I- Tabela de genes diferencialmente expressos

Tabela 06. Genes diferencialmente expressos entre a concentração de 0.5nM de vitamina D e o controle com variação de expressão de 1.5. Distribuição quanto à ontologia gênica (Processo biológico - nível 3).

Classificação Ontológica	Genes Hiperexpressos	Genes Hipoexpressos	p-value	Adjusted p-value
Comunicação celular	OTUD7B,PLCB1,BMP6,ITK,CHN2,CCL19,ALDH1A2,P2RY8,FGF2,PECAM1, FN1,ITGAM,IGFBP5,CD226,GRK5,PTCH1,MAK2,SHE,RPS6KA2,ANGPT2,FRAS1,NOVA1,GUCY1A3,IL1RL1,ADAMDEC1,CD28,IL18R1,APBB1IP,DOK5,PITPNC1,OSM,OXTR,ADRA2A,LIFR,SFRP1,GPR171,EDNRB,ACVRL1,SLC1A2,LCK,CD14,CYP26B1,ERG,KCNK3,RASGRP3,RASGRF2,	PPP1R16B,FGL2,UBB,TLR2,HLA-DRB3,RPS27A,MS4A4A,CCR7,CLIC2,PER3,UBC,EID2,HLA-DRB1,ARHGAP6,BCL2,HCK,LA TS2,BMP2,RGS1,MCTP1,SERP INB9,CALML5,ENPP1,NF1,GZMA,P2RY1,TLR4,FCGR2B,LCP2,ITPR2,DKK1,CXCL6,TEK,SOCS3,FGF7,IQGAP1	0.0130484	0.378404
Apresentação e processamento de antígenos		HLA-DQB1,HLA-DPA1,HLA-DQA2,LOC730415,HLA-DRB5,HLA-DRB3,HLA-DRB1,HLA-DQA1	0.00948869	0.378404
Ativação celular	ITGAM,CD28,CD93,LCK	TLR4,LCP2	0.410806	0.998103
Localização de RNA	SMG1		0.444915	0.998103
Autofagia	ATG9B		0.444915	0.998103
Resposta imune	CR1,CLU,CD226,IL1RL1,CD28,IL18R1,OSM,DPP4,LCK,TCF12,CD14,CCL19,	HLA-DRB3,IGHG1,CCR7,IFI16,IL1RN,FCGR2A,HLA-DRB1,BCL2,HLA-DQA1,RGS1,GZMA,HLA-DQB1,HLA-DPA1,TLR4,FCGR2B,LCP2,HLA-DQA2,CTSS,CXCL6,LOC730415,HLA-DRB5,FCGR2C,TLR2,CD72,IFIH1	0.148917	0.998103
Adesão celular	NID2,PECAM1, FN1,ITGAM,CD226,FRAS1,ADAMDEC1,SELL,HMCN1,CD93,ACVRL1,PGM5	VCAN,CD72,NRP2,SPON1,SPP1,THBS1,	0.0815878	0.998103
Desenvolvimento multicelular	SEMA6D,ALDH1A2,FGF2,NR5A2,HSD11B1,PTCH1,MARK2,ANGPT2,TIMP1,DOK5,THBD,OSM,OSR2,RTN4,SFRP1,NKX3-1,EDNRB,ACVRL1,LCK,TCF12,PDPN,CYP26B1,ERG,MMP11,KRT19,BMP6,DAB1,	UGCG,UBB,SEPP1,KIAA1715,RPS27A,IFI16,UBC,NRP2,SPO N1,HCK,ADAMTS2,BMP2,CALML5,NF1,SEMA3G,NR4A3,SPP1,TLR4,THBS1,DKK1,KIF5C,FB N1,FGF7,ST8SIA4,VCAN,SLC2A3	0.346503	0.998103
Circulação	GUCY1A3,EDNRB,ACVRL1	SOAT1,	0.325849	0.998103
Localização de proteínas	NBEA,STEAP3	LCP2,BLZF1,RPGR,IPO11,STXBP3,	0.46632	0.998103
Proliferação celular	TIMP1,CD28,OSM,OSR2,ADRA2A,LIFR,ACVRL1,ERG,ALDH1A2,FGF2,ITGAM,PTCH1,	BMP2,FANCL,NF1,FGF7,BLZF1,IFI16,EID2	0.0974424	0.998103
Resposta a estímulo biológico	CD226,CCL19,	CCR7,IFI16,BCL2,LYZ,TLR4,CD72,IFIH1	0.305292	0.998103
Processo metabólico secundário	DHRS9		0.444915	0.998103
Reprodução sexual	UBE2B	ADAM28,SLC2A3,SEPP1,ADAMTS2,FANCL	0.229958	0.998103
Maturação	TIMP1,KRT19		0.196899	0.998103
Processo reprodutivo	CD28,THBD,OXTR	BCL2	0.325849	0.998103
Crescimento corpóreo	PTCH1		0.444915	0.998103
Processos metabólicos de macromoléculas	ERG,MMP11,OTUD7B,NID2,BMP6,CHST7,ZNF24,ITK,CPM,FBP1,FGF2,NR5A2,RBM6,USP10,CR1,CLU,E2F7,MMP12,GRK5,CR1L,CDKL3,PTCH1,TCF4,MARK2,RPS6KA2,NOVA1,ADAMDEC1,TIMP1,CD28,BCOR,	ST8SIA4,MRPS5,BLZF1,SLC2A3,ZNF43,PPM1B,UBB,ZNF506,CTBS,IPO11,RNASE2,SCYL2,SOX7,RPS27A,ELL2,ZNF253,IFI16,PER3,UBC,ABHD7,SULF2,ATF1,EID2,ARHGAP6,SUPT16H,HCK,ZNF749,ADAMTS2,LATS2,RIOK3,FANCL,ADAMTS5,CH13	0.504933	0.998103

	FOXF1,UBE2B,OSM,HMCN1,S OX17,SMG1,NKX3- 1,ACVRL1,ZNF709,DPP4,LCK, PGM5,TCF12,TKTL1	L1,GZMA,ADAM28,ALKBH8,NR 4A3,EIF4E,TLR4,SFRS11,HS2S T1,CCRNL4,ZBTB11,MARCH1, ZDHHHC2,ESF1,CTSS,TEK,SOC S3		
Processos metabólicos celulares	COQ2,NOVA1,DHRS9,GUCY1 A3,ADAMDEC1,TIMP1,CD28,B COR,FOXF1,UBE2B,AGPAT4, OSM,HMCN1,SOX17,SMG1,N KX3- 1,ACVRL1,ZNF709,SLC7A2,D PP4,LCK,PGM5,TCF12,TKTL1, CYP26B1,ERG,MMP11,OTUD 7B,NID2,CA2,BMP6,CHST7,ZN F24,ITK,CYP7B1,CPM,ALDH1 A2,CYP24A1,FBP1,FGF2,NR5 A2,RBM6,USP10,CR1,CLU,E2 F7,HSD11B1,MMP12,GRK5,C R1L,CDKL3,PTCH1,TCF4,STE AP3,CILP,MARK2,RPS6KA2	ATF1,EID2,ARHGAP6,SUPT16 H,HCK,ZNF749,ADAMTS2,LAT S2,BMP2,RIOK3,FANCL,ENPP 1,ADAMTS5,CHI3L1,GZMA,AD AM28,ALKBH8,NR4A3,LYZ,SO AT1,EIF4E,TLR4,SFRS11,DHF RL1,HS2ST1,ATP6,CCRNL4,ZB TB11,MARCH1,ZDHHHC2,ACSL 4,ESF1,CTSS,TEK,COX3,SOC S3,ST8SIA4,MRPS5,CA13,BLZ F1,GLS,ZNF43,PPM1B,UGCG, UBB,SEPP1,ZNF506,CTBS,IPO 11,RNASE2,ALOX5,SCYL2,SO X7,RPS27A,ELL2,MTHFD2L,A GPS,ZNF253,IFI16,PER3,UBC, ABHD7,SULF2,	0.361666	0.998103
Processos metabólicos primários	COQ2,NOVA1,DHRS9,GUCY1 A3,ADAMDEC1,TIMP1,CD28,B COR,FOXF1,UBE2B,AGPAT4, OSM,HMCN1,ABCB4,SOX17,S MG1,NKX3- 1,ACVRL1,ZNF709,SLC7A2,D PP4,LCK,PGM5,TCF12,TKTL1, ERG,MMP11,OTUD7B,NID2,P LCB1,BMP6,CHST7,ZNF24,IT K,CYP7B1,CPM,FBP1,FGF2,N R5A2,RBM6,USP10,CR1,CLU, E2F7,HSD11B1,MMP12,GRK5, CR1L,CDKL3,PTCH1,TCF4,CI LP,MARK2,RPS6KA2	ATF1,EID2,ARHGAP6,SUPT16 H,HCK,ZNF749,ADAMTS2,LAT S2,BMP2,RIOK3,FANCL,ENPP 1,DDHD1,ADAMTS5,CHI3L1,G ZMA,ADAM28,ALKBH8,NR4A3, SOAT1,EIF4E,TLR4,SFRS11,D HFR1,HS2ST1,ATP6,CCRNL4 ,ZBTB11,MARCH1,ZDHHHC2,AC SL4,ESF1,CTSS,TEK,SOC3,S T8SIA4,MRPS5,BLZF1,GLS,SL C2A3,ZNF43,PPM1B,UGCG,UB B,ZNF506,CTBS,IPO11,RNASE 2,ALOX5,SCYL2,SOX7,RPS27 A,ELL2,AGPS,ZNF253,IFI16,PE R3,UBC,ABHD7,SULF2, UBB,RPS27A	0.432478	0.998103
Desenvolvimento			0.25595	0.998103
Estrutura anatômica	DOK5,OSM,OSR2,RTN4,SFRP 1,NKX3- 1,EDNRB,ACVRL1,LCK,TCF12 ,PDPN,CYP26B1,MMP11,KRT 19,BMP6,DAB1,SEMA6D,CPM, ALDH1A2,FGF2,NR5A2,HSD1 1B1,IGFBP5,PTCH1,MARK2,A NGPT2,FRAS1,DHRS9,TIMP1, UBE2B	NF1,NR4A3,SPP1,TLR4,THBS1 ,DKK1,KIF5C,FBN1,SOC3,FG F7,ST8SIA4,BLZF1,UGCG,UBB ,SEPP1,RPS27A,IFI16,UBC,NR P2,PALMD,HCK,ADAMTS2,BM P2,CALML5,	0.0857556	0.998103
Regulação de processos biológicos	IGFBP5,GRK5,PTCH1,TCF4,A NGPT2,ADAMDEC1,TIMP1,CD 28,BCOR,FOXF1,OSM,OSR2, SOX17,ADRA2A,LIFR,RTN4,S FRP1,NKX3- 1,EDNRB,ACVRL1,ZNF709,CA RD6,LCK,TCF12,G0S2,PDPN, ERG,RASGRP3,RASGRF2,OT UD7B,PLCB1,BMP6,ZNF24,AL DH1A2,FGF2,PECAM1,NR5A2 ,CR1,CLU,E2F7,	IFI16,PER3,UBC,ATF1,EID2,PA LMD,BCL2,SUPT16H,ZNF749,L ATS2,BMP2,RGS1,FANCL,SER PINB9,NF1,NR4A3,SPP1,EIF4E ,TLR4,THBS1,ZBTB11,ESF1,D KK1,SOC3,FGF7,IQGAP1,IKI P,BLZF1,ZNF43,UBB,TLR2,ZN F506,IFIH1,SOX7,RPS27A,ELL 2,ZNF253	0.125057	0.998103
Coagulação	THBD,HMCN1	PROCR,P2RY1,THBS1,FBN1,T FPI2,;	0.46632	0.998103
Regulação de fluidos corporais	THBD,HMCN1	PROCR,P2RY1,THBS1,FBN1,T FPI2,;	0.46632	0.998103
Deteção de estímulos		TLR4,LXN	0.503967	0.998103
Regulação da qualidade biológica	CCL19,MFI2,NR5A2,IGFBP5,O SM,EDNRB,LCK,	CCR7,BCL2,SOC3,BLZF1	0.22427	0.998103
Regulação da função molecular	FGF2,ADRA2A,EDNRB,LCK,R ASGRP3	BCL2,LATS2,NF1,TLR4	0.51626	0.998103
Produção de citocinas	CD226,CD28,	TLR4,LCP2	1	1
Processo metabólico de compostos nitrogenados	FGF2,SLC7A2,CHST7	CTBS,CHI3L1,DHFR1L1,HS2ST 1,SOC3,GLS,	0.734723	1
Contração muscular	OXTR	DYSF,CALD1,	1	1
Resposta ao estresse	PECAM1,FN1,CR1,CLU,UBE2 B,THBD,OSM,HMCN1,ADRA2 A,SMG1,ACVRL1,CD14,BMP6, CCL19,	ALOX5,CCR7,IFI16,IL1RN,DYS F,PROCR,SUPT16H,BMP2,FAN CL,LYZ,P2RY1,TLR4,THBS1,C XCL6,FBN1,FGF7,TLR2,SEPP1 ,TFPI2	0.85181	1
Defesa	FN1,CR1,CLU,CD14,BMP6,ITK ,CCL19	ALOX5,CCR7,IL1RN,PROCR,B CL2,BMP2,LYZ,TLR4,THBS1,C XCL6,TLR2,IFIH1	0.631562	1
Ciclo celular	G0S2,PLCB1,FGF2,E2F7,PTC H1,CD28,LCK	FGF7,UBB,RPS27A,UBC,BCL2, LATS2,BMP2,NF1,ESCO1	1	1

Segregação cromossômica		<i>RIOK3</i>	1	1
Digestão	<i>MMP11</i>	<i>ADAMTS2</i>	1	1
Comportamento	<i>NOVA1, OSM, CCL19, FGF2, ITGAM, PECAM1</i>	<i>NRP2, ACSL4, CXCL6, SEPP1, RNASE2, CCR7</i>	1	1
Reconhecimento celular	<i>PECAM1</i>	<i>VCAN,</i>	1	1
Processos catabólicos	<i>SMG1, TKTL1, MMP11, PLCB1, USP10, UBE2B,</i>	<i>GLS, UBB, CTBS, RNASE2, RPS27A, UBC, ADAMTS2, DDHD1, CHI3L1, LYZ</i>	0.612189	1
Processos biosintéticos	<i>BMP6, CHST7, CYP7B1, FBP1, CQ2, DHRS9, GUCY1A3, CD28, AGPAT4,</i>	<i>DHFR1, HS2ST1, ATP6, ZDHHC2, ST8SIA4, MRPS5, UGCG, ALOX5, RPS27A, MTHFD2L, AGPS, ALKBH8, EIF4E, TLR4</i>	0.662434	1
Resposta à estímulos externos	<i>FGF2, PECAM1, FN1, CR1, CLU, ITGAM, THBD, HMCN1, ACVRL1, CD14, BMP6, CCL19,</i>	<i>LXN, CCR7, IL1RN, DYSF, NRP2, PROCR, BMP2, ENPP1, LYZ, P2RY1, TLR4, THBS1, CXCL6, FBN1, FGF7, TLR2, TFFI2, RNASE2, ALOX5</i>	0.563071	1
Resposta à estímulos endógenos	<i>UBE2B, SMG1</i>	<i>IFI16, SUPT16H, LATS2, FANCL,</i>	0.69504	1
Morte	<i>CARD6, LCK, CD14, FGF2, CLU, CD28, OSM, TRIM35, RTN4, SFRP1</i>	<i>SOC3, IKIP, TLR2, IFIH1, GULP1, IFI16, BCL2, SERPINB9, GZMA, SPP1, LYZ</i>	0.820275	1
Resposta à estímulos químicos	<i>ABCB1, ABCB4, LCK, CCL19, FGF2, ITGAM,</i>	<i>ENPP1, CXCL6, SEPP1, RNASE2, CCR7, NRP2, BCL2, LATS2</i>	1	1
Remodelação tecidual	<i>BMP6</i>	<i>BMP2, SPP1,</i>	1	1
Processo de desenvolvimento celular	<i>OSM, TRIM35, RTN4, SFRP1, EDNRB, CARD6, LCK, CD14, KRT19, BMP6, DAB1, SEMA6D, ALDH1A2, FGF2, CLU, MARK2, ANGPT2, DHRS9, TIMP1, CD28, UBE2B</i>	<i>NF1, GZMA, SPP1, LYZ, EIF4E, TLR4, KIF5C, SOC3, IKIP, SLC2A3, UBB, TLR2, IFIH1, IPO11, RPS27A, GNPTAB, GULP1, IFI16, UBC, EID2, NRP2, BCL2, BMP2, SERPINB9,</i>	0.742367	1
Divisão celular		<i>LATS2</i>	1	1

Anexo II- Tabela de genes diferencialmente expressos

Tabela 7. Genes diferencialmente expressos entre amostras de câncer de mama expostas *in vitro* a 1,25(OH)₂D₃. 0.5nM e 100nM. Teste Repeated Measures Anova (p< 0.05) e variação de expressão maior ou igual a 2 entre grupo controle (veículo) e grupos de amostras tratadas com 1,25(OH)₂D₃. (0.5nM e 100nM).

Variação de expressão			p	Símbolo gênico	Número de Acesso (Entrez Gene)
([100nM] vs [0.5nM])	([0.5nM] vs [controle])	([100nM] vs [controle])			
1.9056132	1.4514337	2.7658713	0.000248503	CD14	929
1.9500151	1.2067553	2.353191	0.037997710	SFRP1	6422
2.0891616	-1.2686801	1.6467204	0.016752632	ITM2A	9452
1.3630266	1.8222028	2.483711	0.000028910	DPP4	1803
1.5148699	1.4807175	2.2430944	0.000005759	DPP4	1803
1.5413575	1.4034151	2.1631644	0.000202849	THBD	7056
1.5699036	1.4385967	2.2584581	0.001099579	THBD	7056
2.1575482	1.0393828	2.2425184	0.009582042	EDNRB	1910
2.842532	-1.0462463	2.7168863	0.009221020	EDNRB	1910
1.8026448	1.1677711	2.1050766	0.000002774	GRK5	2869
2.0378833	1.1431204	2.3295462	0.004304547	HSD11B1	3290
2.8878174	-1.1990193	2.4084828	0.026121045	TCN1	6947
1.4372578	1.7596492	2.5290694	0.002209554	FOXF1	2294
1.7747836	1.8068185	3.206712	0.000116452	KCNK3	3777
2.0216274	1.0561454	2.1351326	0.000414344	CPM	1368
2.1009462	1.057366	2.2214692	0.002258330	ADAMDEC1	27299
1.8264142	1.1547459	2.1090443	0.008959974	BMP6	654
1.9682932	1.5740869	3.0982645	0.000832641	CILP	8483
2.7612464	-1.5987804	1.7270956	0.018775460	CXCL6	6372

Anexo

Variação de expressão			<i>p</i>	Símbolo gênico	Número de Acesso (Entrez Gene)
([100nM] vs [0.5nM])	([0.5nM] vs [controle])	([100nM] vs controle)			
9.9926815	12.983537	129.74036	0.000012010	CYP24A1	1591
2.0965915	1.083564	2.2717912	0.012579417	EDNRB	1910
1.4980178	1.3717647	2.0549278	0.013273500	CD226	10666
1.3594041	1.5612154	2.1223226	0.033893414	CYP7B1	9420
-1.6576703	-1.3739692	-2.277588	0.008343658	P2RY1	5028
2.8342943	1.3909672	3.9424107	0.000699939	IL1RL1	9173
1.9974298	1.8225201	3.6403565	0.001008773	CA2	760
2.5573318	-1.0056201	2.5430393	0.035358190	CHI3L1	1116
1.699765	1.4270664	2.4256775	0.009553582	FBP1	2203
2.2688138	1.2515875	1.8127489	0.014673339	IL33	90865
1.8626798	1.2144948	2.262215	0.005187963	NR5A2	2494
1.6029547	1.4295365	2.2914824	0.001341103	SULT1C2	6819
1.4542251	1.4917061	2.1692765	0.010162880	DPP4	1803
1.6360695	1.3837875	2.2639728	0.000269298	CHN2	1124
1.5690674	1.6166825	2.5366838	0.001181204	G0S2	50486
2.065487	-1.0072478	2.0506244	0.023355836	APLNR	187
1.6303864	1.5274355	2.4903102	0.000210910	TKTL1	8277
1.2959043	1.5686353	2.0328014	0.000016052	EFTUD1	79631
1.112316	1.939349	2.157169	0.035735425	CYP26B1	56603
2.2918682	1.0109503	2.3169649	0.034764346	OGN	4969
2.0056973	-1.5819874	1.267834	0.011744375	ZDHHC2	51201
2.09948	-1.1396915	1.8421476	0.008975900	C2orf40	84417
-2.3889363	1.0079721	-2.370042	0.007912692	BCOR	54880
1.9497834	1.0669366	2.0802953	0.049629520	SLC7A2	6542
1.5106264	1.3399719	2.024197	0.026721190	FAM20A	54757

Anexo

Variação de expressão			<i>p</i>	Símbolo gênico	Número de Acesso (Entrez Gene)
([100nM] vs [0.5nM])	([0.5nM] vs [controle])	([100nM] vs controle)			
1.5672039	1.3874539	2.174423	0.000066479	TMEM37	140738
2.0609908	-1.2123876	1.6999438	0.001349935	FGL2	10875
2.8950384	-1.5882527	1.822782	0.005262655	GIMAP7	168537
1.9310882	1.1783202	2.2754402	0.009469141	DAB1	1600
1.8382767	1.1050352	2.0313604			
2.2390354	-1.0474486	2.1376088	0.008038475	ADAMTS5	11096
2.2089942	1.3053831	2.8835835	0.001011260	SHE	126669
2.3779902	1.2304746	2.9260569	0.016524356	PI15	51050
2.199364	-1.6755896	1.3125911	0.025801897	ATP11A	23250
1.7524152	1.2608466	2.209527			
2.0168123	1.087176	2.1926298	0.017000288	HMCN1	83872
1.724602	1.3081409	2.2560225	0.000127884	THBD	7056
-1.3317118	-1.8897244	-2.516568			
1.8650649	1.209776	2.2563107	0.001421760	IL1RL1	9173
1.6219531	1.3038508	2.1147847	0.000570129	CD300LF	146722
2.1569934	1.4345607	3.094338	0.000416610	TMEM37	140738
2.1353745	-1.5892168	1.3436645	0.000252317	FGF7 /// KGFLP1 /// KGFLP2	2252 /// 387628 /// 654466
2.2535925	-1.7438264	1.2923262	0.003385573	C16orf54 /// hCG_1644884	283897 /// 728070

Anexo III – Coloração de Ponceau

Figura 40. Proteína total extraída de linhagens HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D por 48 horas e imobilizada em membrana de nitrocelulose. Membrana de nitrocelulase destinada a marcação com anticorpo anti-CA2.

Figura 38. Proteína total extraída de linhagens HME, HME^{LT}, HME^{PR} e MCF7 tratadas com veículo, 0.5nM e 100nM de vitamina D por 48 horas e imobilizada em membrana de nitrocelulose. Membrana de nitrocelulase destinada a marcação com anticorpo anti-CD14.

**Anexo IV – Aprovação do comitê de Ética em Pesquisa do
Hospital das Clínicas e Faculdade de Medicina de São Paulo**

Ref. Carta datada de 16.08.07

Ao

Departamento de Radiologia

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03.10.07, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº 626/06 intitulado "ANÁLISE DO PERFIL MOLECULAR DE TUMOR DE MAMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL EM CULTURA DE TECIDO ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM VITAMINA D", contempla o sub-projeto intitulado "ANÁLISE DAS AMOSTRAS TUMORASIS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA APÓS TRATAMENTO IN VITRO COM VITAMINA D ", que será tese de doutorado da Sra. Cíntia Milani, tendo como orientadora Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira.

São Paulo, 16 de outubro de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

7. Referências Bibliográficas

Affymetrix, Inc. "GeneChip® Expression Analysis Technical Manual" http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx.

Ainsleigh HG. Beneficial effects of sun exposure on cancer mortality. *Prev Med*. 1993 ;22(1):132-40.

Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer*. 2007 ;7(2):139-47.

Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE, Wu-Wong JR. Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006 ;57(2):234-40.

Aytac U, Claret FX, Ho L, Sato K, Ohnuma K, Mills GB, Cabanillas F, Morimoto C, Dang NH. Expression of CD26 and its associated dipeptidyl peptidase IV enzyme activity enhances sensitivity to doxorubicin-induced cell cycle arrest at the G(2)/M checkpoint. *Cancer Res* 2001 ;61(19):7204-10.

Barbosa EM, Nonogaki S, Katayama ML, Folgueira MA, Alves VF, Brentani MM. Vitamin D3 modulation of plasminogen activator inhibitor type-1 in human breast carcinomas under organ culture. *Virchows Arch*. 2004 ;444(2):175-82.

Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, Brandtzaeg P, Erard M, Haraldsen G, Girard JP. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol*. 2003 ;163(1):69-79.

Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I: Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res*. 2001, 125(1–2):279-284.

Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC, Hankinson SE. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14: 1991-7.

Berwick M, Armstrong BK, Ben-Porat L, Fine J, Kricker A, Eberle C, Barnhill R. Sun exposure and mortality from melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97: 195-9.

Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19(2):185-93.

Bortman P, Folgueira MA, Katayama ML, Snitcovsky IM, Brentani MM. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on breast cells: a mini review. *Braz J Med Biol Res*. 2002 ;35(1):1-9.

Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, Washington MK, Neilson EG, Moses HL. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science*. 2004 ;303(5659):848-51.

Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol*. 1999 ;277(2 Pt 2):F157-75.

Brunner M, Krenn C, Roth G, Moser B, Dworschak M, Jensen-Jarolim E, Spittler A, Sautner T, Bonaros N, Wolner E, Boltz-Nitulescu G, Ankersmit HJ. Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma. *Intensive Care Med.* 2004 ;30(7):1468-73.

Byrne HM, Alarcon T, Owen MR, Webb SD, Maini PK. Modelling aspects of cancer dynamics: a review. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* 2006 ;364(1843):1563-78.

Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermiller B, Barbacioru CC, Boysen C, Hunkapiller K, Jensen RV, Knight CR, Lee KY, Ma Y, Maqsoodi B, Papallo A, Peters EH, Poulter K, Ruppel PL, Samaha RR, Shi L, Yang W, Zhang L, Goodsaid FM. Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol.* 2006 ;24(9):1115-22.

Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R, Mohsin S, Osborne CK, Chamness GC, Allred DC, O'Connell P. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet.* 2003 ;362(9381):362-9.

Chen KS, DeLuca HF. Cloning of the human 1 α ,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochim Biophys Acta.* 1995 ;1263(1):1-9.

Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* 2003 ;85-A(8):1544-52.

Chlebowski RT, Johnson KC, Kooperberg C, Pettinger M, Wactawski-Wende J, Rohan T, Rossouw J, Lane D, O'Sullivan MJ, Yasmeen S, Hiatt RA, Shikany JM, Vitolins M, Khandekar J, Hubbell FA; Women's Health Initiative Investigators. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2008 ;100(22):1581-91.

Colston KW, Hansen CM. Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2002 ;9(1):45-59.

Colston KW, Berger U, Coombes RC. Possible role for vitamin D in controlling breast cancer cell proliferation. *Lancet.* 1989 ;1(8631):188-91.

Crew KD, Shane E, Cremers S, McMahon DJ, Irani D, Hershman DL. High prevalence of vitamin D deficiency despite supplementation in premenopausal women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2009 ;27(13):2151-6.

Cross HS, Bareis P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Peterlik M. 25-Hydroxyvitamin D(3)-1 α -hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids.* 2001 ;66(3-5):287-92.

- Cui Y, Rohan TE. Vitamin D, calcium, and breast cancer risk: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 ;15(8):1427-37.
- Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ, Beesley AH, Hoffmann K, Terry PA, Freitas JR, Boag JM, Cummings AJ, Kees UR. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? *BMC Genomics.* 2005 ;6(1):59.
- David JP, Rincon M, Neff L, Horne WC, Baron R. Carbonic anhydrase II is an AP-1 target gene in osteoclasts. *J Cell Physiol.* 2001 ;188(1):89-97.
- Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature.* 1998 ;392(6675):505-9.
- Draper L. Breast cancer: trends, risks, treatments, and effects. *AAOHN J.* 2006 ;54(10):445-51; quiz 452-3.
- Dodgson SJ, Tashian RE, Gross G, Carter ND. The Carbonic Anhydrases: Cellular Physiology and Molecular Genetics. 1991. New York: Plenum.
- Du J, Yang S, An D, Hu F, Yuan W, Zhai C, Zhu T. BMP-6 inhibits microRNA-.21 expression in breast cancer through repressing delta EF1 and AP-1. *Cell Res.* 2009 ;19(4):487-96.
- Du J, Yang S, Wang Z, Zhai C, Yuan W, Lei R, Zhang J, Zhu T. Bone morphogenetic protein 6 inhibit stress-induced breast cancer cells apoptosis via both Smad and p38 pathways. *J Cell Biochem.* 2008 ;103(5):1584-97.
- Dunlop TW, Vaisanen S, Frank C, Carlberg C. The genes of the coactivator TIF2 and the corepressor SMRT are primary 1alpha,25(OH)2D3 targets. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 ;89-90(1-5):257-60.
- Eigeliene N, Harkonen P, Erkkola R. Effects of estradiol and medroxyprogesterone acetate on morphology, proliferation and apoptosis of human breast tissue in organ cultures. *BMC Cancer.* 2006 ;6:246.
- Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, Weinberg RA. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev.* 2001 ;15(1):50-65.
- Falkenstein E, Norman AW, Wehling M. Mannheim classification of non-genomically initiated rapid steroid actions. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000, 85:2072–2075.
- Fan J, Liu S, Du Y, Morrison J, Shipman R, Pang KS. Up-regulation of transporters and enzymes by the vitamin D receptor ligands, 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and vitamin D analogs, in the Caco-2 cell monolayer. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009 ;330(2):389-402.
- Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallett M, Park M. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med.* 2008 ;14(5):518-27.
- Folgueira MA, Carraro DM, Brentani H, Patrão DF, Barbosa EM, Netto MM, Caldeira JR, Katayama ML, Soares FA, Oliveira CT, Reis LF, Kaiano JH, Camargo LP, Vêncio

RZ, Snitcovsky IM, Makdissi FB, e Silva PJ, Góes JC, Brentani MM. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(20):7434-43.

Folgueira MAAK, Honda ST, Benvenuti TT, Rozencham PB, Santos RPC, Carraro DM, Brentani H, Katayama MLH, Lyra EC, Brentani MM. Differential gene profiling of malignant cells and fibroblasts from the primary and metastatic sites from breast cancer patients upon stroma-epithelial cell interaction. *ASCO Annual Meeting*, 2006, Atlanta. *Journal of Clinical Oncology.* v. 24. p. 10570.

Folgueira MAAK, Honda ST, Santos RPC, Katayama MLH, Brentani H, Carraro DM, Rozencham PB, Kaiano JH, Lyra EC, Brentani MM. Fibroblasts from involved and uninvolved lymph nodes from breast cancer patients may influence gene expression of malignant breast cells. In: 97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2006, Washington. Proceedings 97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2006. v. 47. p. 5016-5016.

Freake HC, Abeasekekera G, Iwasaki J, Marocci C, MacIntyre RA, McClelland RA, Skilton RA, Easton DF and Coombes RC. Measurement of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in breast cancer and relationship to biochemical and clinical indices. *Cancer Res.* 1984, 46:1677–1681.

Gache C, Berthois Y, Cvitkovic E, Martin PM, Saez S. Differential regulation of normal and tumoral breast epithelial cell growth by fibroblasts and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Breast Cancer Res Treat.* 1999 ;55(1):29-39.

Garland FC, Garland CF, Gorham ED, Young JF. Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev Med.* 1990 ;19(6):614-22.

Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Koo J, Hood N. Prognostic effects of 25-hydroxyvitamin D levels in early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009 ;27(23):3757-63.

Gorham ED, Garland FC, Garland CF. Sunlight and breast cancer incidence in the USSR. *Int J Epidemiol.* 1990 ;19(4):820-4.

Grant WB, Garland CF. The association of solar ultraviolet B (UVB) with reducing risk of cancer: multifactorial ecologic analysis of geographic variation in age-adjusted cancer mortality rates. *Anticancer Res.* 2006A; 26(4A):2687-99.

Grant WB. The likely role of vitamin D from solar ultraviolet-B irradiance in increasing cancer survival. *Anticancer Res.* 2006B; 26(4A):2605-14.

Haga Y, Yanagisawa K, Ohto-Ozaki H, Tominaga S, Masuzawa T, Iwahana H. The effect of ST2 gene product on anchorage-independent growth of a glioblastoma cell line, T98G. *Eur J Biochem.* 2003 ;270(1):163-70.

Hager G, Formanek M, Gedlicka C, Thurnher D, Knerer B, Kornfehl J. 1,25(OH)₂ vitamin D₃ induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes P21 and P27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Acta Otolaryngol.* 2001;121(1):103-9.

Havre PA, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front Biosci.* 2008 ;13:1634-45.

Hee CK, Nicoll SB. Endogenous bone morphogenetic proteins mediate 1 α , 25-dihydroxyvitamin D(3)-induced expression of osteoblast differentiation markers in human dermal fibroblasts. *J Orthop Res*. 2009 ;27(2):162-8.

Holick MF. Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006 ;92(1):49-59.

Holick MF. Vitamin D and sunlight: strategies for cancer prevention and other health benefits. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 ;3(5):1548-54.

Hussain-Hakimjee EA, Peng X, Mehta RR, Mehta RG. Growth inhibition of carcinogen-transformed MCF-12F breast epithelial cells and hormone-sensitive BT-474 breast cancer cells by 1 α -hydroxyvitamin D₅. *Carcinogenesis*. 2006 ;27(3):551-9.

INCA – Ministério da Saúde, Brasil; 2010. Disponível em <http://www.inca.org.br>.

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP: Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003, 4(2):249-264.

Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*. 2003 ;31(4):e15.

Janowsky EC, Lester GE, Weinberg CR, Millikan RC, Schildkraut JM, Garrett PA, Hulka BS. Association between low levels of 1,25-dihydroxyvitamin D and breast cancer risk. *Public Health Nutrition*. 1999; 2: 283-291.

Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C. Evidence for persistent vitamin D 1- α -hydroxylation in hemodialysis patients: evolution of serum 1,25-dihydroxycholecalciferol after 6 months of 25-hydroxycholecalciferol treatment. *Nephron Clin Pract*. 2008;110(1):c58-65.

Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev*. 1998 ;78(4):1193-231.

Katayama ML, Pasini FS, Folgueira MA, Snitcovsky IM, Brentani MM. Molecular targets of 1,25(OH)₂D₃ in HC11 normal mouse mammary cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003 ;84(1):57-69.

Kawata H, Kamiakito T, Takayashiki N, Tanaka A. Vitamin D₃ suppresses the androgen-stimulated growth of mouse mammary carcinoma SC-3 cells by transcriptional repression of fibroblast growth factor 8. *J Cell Physiol*. 2006 ;207(3):793-9.

Kemmis CM, Salvador SM, Smith KM, Welsh J. Human mammary epithelial cells express CYP27B1 and are growth inhibited by 25-hydroxyvitamin D-3, the major circulating form of vitamin D-3. *J Nutr*. 2006 ;136(4):887-92.

Kemmis CM, Welsh J. Mammary epithelial cell transformation is associated with deregulation of the vitamin D pathway. *J Cell Biochem*. 2008 ;105(4):980-8.

- Kim JB, Stein R, O'Hare MJ. Tumour-stromal interactions in breast cancer: the role of stroma in tumourigenesis. *Tumour Biol.* 2005 ;26(4):173-85.
- Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nat Rev Cancer.* 2004 ;4(7):519-27.
- Krumdieck CL, dos Santos JE, Ho KJ. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal Biochem.* 1980 ;104(1):118-23.
- Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L, Richardson A, Weinberg RA. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 ; 101:4966-71.
- Laitala T, Väänänen HK. Inhibition of bone resorption in vitro by antisense RNA and DNA molecules targeted against carbonic anhydrase II or two subunits of vacuolar H(+)-ATPase. *J Clin Invest.* 1994 ;93(6):2311-8.
- Lambeir AM, Proost P, Durinx C, Bal G, Senten K, Augustyns K, Scharpé S, Van Damme J, De Meester I. Kinetic investigation of chemokine truncation by CD26/dipeptidyl peptidase IV reveals a striking selectivity within the chemokine family. *J Biol Chem.* 2001;276(32):29839-45.
- Lee HJ, Liu H, Goodman C, Ji Y, Maehr H, Uskokovic M, Notterman D, Reiss M, Suh N. Gene expression profiling changes induced by a novel Gemini Vitamin D derivative during the progression of breast cancer. *Biochem Pharmacol.* 2006 ;72(3):332-43.
- Leiting B, Pryor KD, Wu JK, Marsilio F, Patel RA, Craik CS, Ellman JA, Cummings RT, Thornberry NA. Catalytic properties and inhibition of proline-specific dipeptidyl peptidases II, IV and VII. *Biochem J.* 2003 ;371(Pt 2):525-32.
- LeVan TD, Bloom JW, Bailey TJ, Karp CL, Halonen M, Martinez FD, Vercelli D. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol.* 2001 ;167(10):5838-44.
- Lin J, Manson JE, Lee IM, Cook NR, Buring JE, Zhang SM. Intakes of calcium and vitamin D and breast cancer risk in women. *Arch Intern Med.* 2007 ;167(10):1050-9.
- Lin R, Nagai Y, Sladek R, Bastien Y, Ho J, Petrecca K, Sotiropoulou G, Diamandis EP, Hudson TJ, White JH. Expression profiling in squamous carcinoma cells reveals pleiotropic effects of vitamin D3 analog EB1089 signaling on cell proliferation, differentiation, and immune system regulation. *Mol Endocrinol.* 2002 ;16(6):1243-56.
- Lips P. Vitamin D physiology. *Progress Biophys Mol Biol.* 2006; 92:4-8.
- Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. *Molecular Cell Biology.* 4^aed. Nova York: W. H. Freeman & Co.; c2000.
- Lowe LC, Guy M, Mansi JL, Peckitt C, Bliss J, Wilson RG, Colston W. Plasma 25-hydroxy vitamin D concentration, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. *Eur J Cancer.* 2005; 41: 1164-69.

Lyra EC, da Silva IA, Katayama ML, Brentani MM, Nonogaki S, Goes JC, Folgueira MA. 25(OH)D₃ and 1,25(OH)₂D₃ serum concentration and breast tissue expression of 1 α -hydroxylase, 24-hydroxylase and Vitamin D receptor in women with and without breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006 ;100(4-5):184-92.

Majewski J, Ott J: Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Res*. 2002, 12(12):1827-1836.

Mallory JC, Crudden G, Oliva A, Saunders C, Stromberg A, Craven RJ. A novel group of genes regulates susceptibility to antineoplastic drugs in highly tumorigenic breast cancer cells. *Mol Pharmacol*. 2005 ;68(6):1747-56.

Marchionatti AM, Picotto G, Narvaez CJ, Welsh J, Tolosa de Talamoni NG. Antiproliferative action of menadione and 1,25(OH)₂D₃ on breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009 ;113(3-5):227-32.

Masur K, Schwartz F, Entschladen F, Niggemann B, Zaenker KS. DPP-IV inhibitors extend GLP-2 mediated tumour promoting effects on intestinal cancer cells. *Regul Pept*. 2006;137(3):147-55.

Mehta RG, Mehta RR. Vitamin D and cancer. *J Nutr Biochem* 2002;13:252–64.

Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept*. 1999 ;85(1):9-24

Mercier T, Chaumontet C, Gaillard-Sanchez I, Martel P, Heberden C. Calcitriol and lexicalcitol (KH1060) inhibit the growth of human breast adenocarcinoma cells by enhancing transforming growth factor-beta production. *Biochem Pharmacol*. 1996 ;52(3):505-10.

Mizwicki MT, Norman AW The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci Signal*. 2009 ;2(75):re4.

Moeenrezakhanlou A, Nandan D, Reiner NE. Identification of a Calcitriol-Regulated Sp-1 Site in the Promoter of Human CD14 using a Combined Western Blotting Electrophoresis Mobility Shift Assay (WEMSA). *Biol Proced Online*. 2008;10:29-35.

Moffatt KA, Johannes WU, Hedlund TE, Miller GJ. Growth inhibitory effects of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D(3) are mediated by increased levels of p21 in the prostatic carcinoma cell line ALVA-31. *Cancer Res*. 2001;61(19):7122-9.

Moriarty RM, Albinescu D. Synthesis of 1 α -hydroxyvitamin D₅ using a modified two wavelength photolysis for vitamin D formation. *J Org Chem*. 2005 ;70(19):7624-8.

Murillo G, Mehta RG. Chemoprevention of chemically-induced mammary and colon carcinogenesis by 1 α -hydroxyvitamin D₅. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005 ;97(1-2):129-36.

Narvaez CJ, Welsh J. Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and tetradecanoylphorbol acetate on cell cycle and apoptosis of MCF-7 cells and a vitamin D₃-resistant variant. *Endocrinology*. 1997 ;138(11):4690-8.

Nemere I, Farach-Carson MC, Rohe B, Sterling TM, Norman AW, Boyan BD, Safford SE. Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)₂D₃ membrane binding protein (1,25D₃-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(19):7392-7.

Nemere I, Safford SE, Rohe B, DeSouza MM, Farach-Carson MC. Identification and characterization of 1,25D₃-membrane-associated rapid response, steroid (1,25D₃-MARRS) binding protein. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 ;89-90(1-5):281-5.

Norman AW, Song X, Zanello L, Bula C, Okamura WH. Rapid and genomic biological responses are mediated by different shapes of the agonist steroid hormone, 1 α ,25(OH)₂vitamin D₃. *Steroids*. 1999;64(1-2):120-8.

Oda T, Kujovich J, Reis M, Newman B, Druker BJ. Identification and characterization of two novel SH2 domain-containing proteins from a yeast two hybrid screen with the ABL tyrosine kinase. *Oncogene*. 1997 ;15(11):1255-62.

Okoniewski MJ, Hey Y, Pepper SD, Miller CJ: High correspondence between Affymetrix exon and standard expression arrays. *Biotechniques*. 2007, 42(2):181-185.

Palmer G, Lipsky BP, Smithgall MD, Meininger D, Siu S, Talabot-Ayer D, Gabay C, Smith DE. The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33. *Cytokine*. 2008 ;42(3):358-64.

Palmieri C, MacGregor T, Girgis S, Vigushin D. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in early and advanced breast cancer. *J Clin Pathol*. 2006 ;59(12):1334-6.

Parrish AR, Gandolfi AJ, Brendel K. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci*. 1995;57(21):1887-901.

Pendas-Franco N, Gonzalez-Sancho JM, Suarez Y, Aguilera O, Steinmeyer A, Gamallo C, Berciano MT, Lafarga M, Munoz A. Vitamin D regulates the phenotype of human breast cancer cells. *Differentiation*. 2007 Mar;75(3):193-207.

Peng X, Hawthorne M, Vaishnav A, St-Arnaud R, Mehta RG. 25-Hydroxyvitamin D₃ is a natural chemopreventive agent against carcinogen induced precancerous lesions in mouse mammary gland organ culture. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;113(1):31-41.

Pike MC, Krailo MD, Henderson BE, Casagrande JT, Hoel DG.'Hormonal' risk factors, 'breast tissue age' and the age-incidence of breast cancer. *Nature*. 1983 ;303(5920):767-70.

Prentice RL, Thomson CA, Caan B, Hubbell FA, Anderson GL, Beresford SA, Pettinger M, Lane DS, Lessin L, Yasmeeen S, Singh B, Khandekar J, Shikany JM, Satterfield S, Chlebowski RT. Low-fat dietary pattern and cancer incidence in the Women's Health Initiative Dietary Modification Randomized Controlled Trial. *J Natl Cancer Inst*. 2007 ;99(20):1534-43.

Quigley DA, To MD, Pérez-Losada J, Pelorosso FG, Mao JH, Nagase H, Ginzinger DG, Balmain A. Genetic architecture of mouse skin inflammation and tumour susceptibility. *Nature*. 2009 ;458(7237):505-8.

Robinson MD, Speed TP. A comparison of Affymetrix gene expression arrays. *BMC Bioinformatics*. 2007; 8:449.

Rickard DJ, Hofbauer LC, Bonde SK, Gori F, Spelsberg TC, Riggs BL. Bone morphogenetic protein-6 production in human osteoblastic cell lines. Selective regulation by estrogen. *J Clin Invest*. 1998 ;101(2):413-22.

Rozenchan PB, Carraro DM, Brentani H, de Carvalho Mota LD, Bastos EP, e Ferreira EN, Torres CH, Katayama ML, Roela RA, Lyra EC, Soares FA, Folgueira MA, Góes JC, Brentani MM. Reciprocal changes in gene expression profiles of cocultured breast epithelial cells and primary fibroblasts. *Int J Cancer*. 2009;125(12):2767-77.

Saramäki A, Banwell CM, Campbell MJ, Carlberg C: Regulation of the human p21^(waf1/cip1) gene promoter via multiple binding sites for p53 and the vitamin D₃ receptor. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:543-554.

Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005 ;23(5):479-90.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006 ;7:3.

Schwartz GG, Hulka BS Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis). *Anticancer Res*. 1990; 10: 1307-11.

Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, Collins PJ, de Longueville F, Kawasaki ES, Lee KY, et al.: The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol*. 2006, 24(9):1151-1161.

Shin MH, Holmes MD, Hankinson SE, Wu K, Colditz GA, Willett WC. Intake of dairy products, calcium, and vitamin d and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002 ;94(17):1301-11.

Silberstein GB. Tumour-stromal interactions. Role of the stroma in mammary development. *Breast Cancer Res*. 2001;3(4):218-23.

Smedby KE, Hjalgrim H, Melbye M, Torrång A, Rostgaard K, Munksgaard L, Adami J, Hansen M, Porwit-MacDonald A, Jensen BA, Roos G, Pedersen BB, Sundström C, Glimelius B, Adami HO. Ultraviolet radiation exposure and risk of malignant lymphomas. *J Natl Cancer Inst*. 2005 ;97(3):199-209.

Smith DC, Johnson CS, Freeman CC, Muindi J, Wilson JW, Trump DL. A Phase I trial of calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res*. 1999 ;5(6):1339-45.

Sobral RA, Honda ST, Katayama ML, Brentani H, Brentani MM, Patrão DF, Folgueira MA. Tumor slices as a model to evaluate doxorubicin in vitro treatment and expression of trios of genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 and PRSS11, MTSS1, SMYD2 in canine mammary gland cancer. *Acta Vet Scand*. 2008 ;50:27.

Sundaram S, Sea A, Feldman S, Strawbridge R, Hoopes PJ, Demidenko E, Binderup L, Gewirtz DA. The combination of a potent vitamin D3 analog, EB 1089, with ionizing radiation reduces tumor growth and induces apoptosis of MCF-7 breast tumor xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res.* 2003 ;9(6):2350-6.

Swami S, Raghavachari N, Muller UR, Bao YP, Feldman D. Vitamin D growth inhibition of breast cancer cells: gene expression patterns assessed by cDNA microarray. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;80(1):49-62.

Townsend K, Banwell CM, Guy M, Colston KW, Mansi JL, Stewart PM, Campbell MJ, Hewison M. Autocrine metabolism of vitamin D in normal and malignant breast tissue. *Clin Cancer Res.* 2005 ;11(9):3579-86.

Townsend K, Trevino V, Falciani F, Stewart PM, Hewison M, Campbell MJ. Identification of VDR-responsive gene signatures in breast cancer cells. *Oncology.* 2006;71(1-2):111-23.

Urata YN, Milani C, Lyra EC, Katayama MLH, Basso RA, Schor AP, Silva TF, Goes JCGS, Brentani MM, Folgueira MAK. Breast Cancer Gene Expression Profile in Post-Menopausal Patients Supplemented with Vitamin D. Abstract: [6128]; *32nd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium.* 2009. San Antonio, Texas, EUA.

Wactawski-Wende J, Kotchen JM, Anderson GL, Assaf AR, Brunner RL, O'Sullivan MJ, Margolis KL, Ockene JK, Phillips L, Pottern L, Prentice RL, Robbins J, Rohan TE, Sarto GE, Sharma S, Stefanick ML, Van Horn L, Wallace RB, Whitlock E, Bassford T, Beresford SA, Black HR, Bonds DE, Brzyski RG, Caan B, Chlebowski RT, Cochrane B, Garland C, Gass M, Hays J, Heiss G, Hendrix SL, Howard BV, Hsia J, Hubbell FA, Jackson RD, Johnson KC, Judd H, Kooperberg CL, Kuller LH, LaCroix AZ, Lane DS, Langer RD, Lasser NL, Lewis CE, Limacher MC, Manson JE; Women's Health Initiative Investigators. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2006 ;354: 684-96. Erratum in: *N Engl J Med.* 2006; 354: 1102.

Wali RK, Baum CL, Sitrin MD e Brasitus TA. $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D3 stimulates membrane phosphoinositide turnover, activates protein kinase C and increases cytosolic calcium in rat colonic epithelium. *J Clin Invest.* 1990;85:1296-1303.

Wang Q, Yang W, Uytingco MS, Christakos S, Wieder R. $1,25$ -Dihydroxyvitamin D3 and all-trans-retinoic acid sensitize breast cancer cells to chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res.* 2000 ;60(7):2040-8.

Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, Bourdeau V, Konstorium A, Lallemant B, Zhang R, Mader S, White JH. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct $1,25$ -dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol.* 2005;19(11):2685-95.

Wesley UV, Albino AP, Tiwari S, Houghton AN. A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells. *J Exp Med.* 1999 ;190(3):311-22.

Wood IS, Wang B, Trayhurn P. IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 ;384(1):105-9.

Wu Y, Craig TA, Lutz WH, Kumar R: Identification of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ response elements in the human transforming growth factor β 2 gene. *Biochemistry*. 1999; 38:2654-2660.

Yanagisawa K, Naito Y, Kuroiwa K, Arai T, Furukawa Y, Tomizuka H, Miura Y, Kasahara T, Tetsuka T, Tominaga S. The expression of ST2 gene in helper T cells and the binding of ST2 protein to myeloma-derived RPMI8226 cells. *J Biochem*. 1997 ;121(1):95-103.

Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, Pitman N, Kurowska-Stolarska M, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 ;105(31):10913-8.

Zhu WY, Jones CS, Kiss A, Matsukuma K, Amin S, De Luca LM. Retinoic acid inhibition of cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Exp Cell Res*. 1997 ;234(2):293-9.

Apêndice

Atividades desenvolvidas no período

Poster: 32nd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, December 9-13, 2009; Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, Texas, USA. (Abstract number: 6128)

Breast Cancer Gene Expression Profile in Post-Menopausal Patients Supplemented with Vitamin D. Urata YN, Milani C, Lyra EC, Katayama MLH, Basso RA, Schor AP, Silva TF, Goes JCGS, Brentani MM, Folgueira MAK Faculdade de Medicina - Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil; Instituto Brasileiro de Controle do Cancer, Sao Paulo, SP, Brazil.

Vitamin D supplementation is indicated for post-menopausal women to prevent osteoporosis and lower 25(OH)2D3 or 1,25(OH)2D3 serum levels have been associated with breast cancer incidence or prognosis (metastasis). The antiproliferative effects of vitamin D are observed in breast cancer cell lines exposed to pharmacological doses of calcitriol (1,25(OH)2D3, 100nM) but whether physiological doses are sufficient to produce growth inhibition *in vivo* is not known. The aim of our study was to investigate gene expression profile changes of breast cancer samples from patients supplemented with calcitriol, presenting an anti-proliferative effect on the tumor. Post-menopausal women diagnosed with breast cancer were instructed to take one (0.25ug/day, n=8) or two (0.50ug/day, n=8) tablets of calcitriol after tumor biopsy. Median time of supplementation was 30 days. Sixteen tumor samples were collected during biopsy (before supplementation) and breast surgery (after supplementation). Proliferation index was evaluated by tumor Ki-67 immunohistochemistry (IHC) expression in breast cancer samples before and after calcitriol supplementation and 1000 cells were counted by three observers ($p < 0,001$, Pearson's correlation). After establishing a counting error between observers, the cut-off value was fixed in 26.53% (percentile 60%) to define response. Patients were then categorized as responsive (a reduction of more than 26.53% on positive Ki-67 positive cells) and non-responsive (difference between samples before and after supplementation not exceeding 26.53%). Among our sixteen patients, all were categorized as responsive to calcitriol supplementation except for two. So far, gene expression profile of two patients (both categorized as responsive) has been analyzed using the U133 Plus 2.0 Affymetrix Gene Chips from 100ng of total RNA. To verify signalling pathways possibly involved in response to vitamin D exposure, additional five samples from a parallel study, in which breast cancer samples from post menopausal patients were collected at surgery and treated *in vitro* with a low concentration of calcitriol, 0.5nM (that can be attained with subcutaneous administration of doses of 8ug calcitriol, without hypercalcemia) for 24h, were included in the analysis. All samples had RNA hybridized to the same gene chips. Results were normalized and analyzed using RMA and Mev.TM4 softwares. *CYP24A1*, a target gene of vitamin D, presented a positive regulation after calcitriol supplementation in all samples analyzed. Differentially expressed genes were involved in the regulation of cell cycle [*SMAD2*, cyclin E, *YWHAQ* (14-3-3 family) and calcium signalling (*HTR7*, *PTGER1* and *PTGER2*). Our results indicate that the tumor proliferation index is reduced upon calcitriol supplementation. Moreover, potentially regulated pathways in breast cancer specimens after administration of low doses of calcitriol are regulation of cell cycle and calcium signaling. Supported by FAPESP 2007/01111-0 – 2007/04799-2.

Submissão artigo científico

The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology .

Title: HUMAN BREAST TUMOR SLICES: A MODEL FOR IDENTIFICATION OF VITAMIN D REGULATED GENES IN THE TUMOR MICROENVIRONMENT.

Poster: 5th International Conference on Tumor Microenvironment: Progression, Therapy & Prevention, Versailles, France, October 20-24, 2009.
(Abstract number: 481018)

Human Breast Organotypic Culture: Identification of Vitamin D regulated Genes in Tumor Microenvironment. C. Milani¹, J. Welsh², M.L. Katayama¹, E. Lyra³, M. Maciel⁴, M. Brentani¹, M.A.K. Folgueira¹; ¹Departamento de Radiologia, Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Biomedical Sciences, School of Public Health, University at Albany, Rensselaer, USA; ³Instituto Brasileiro de Controle do Câncer, São Paulo, Brazil; ⁴Hospital do Câncer, São Paulo, Brazil.

Background: Vitamin D (VD) effects on stromal-epithelium interactions may interfere with breast cancer (BC) development. We have previously identified some regulated genes in a BC organ culture model, which preserves epithelial mesenchymal interactions. Our present aim was to specifically evaluate the epithelial component behavior and determine whether candidate genes were directly modulated by VD in breast cell lines or indirectly regulated through stromal interactions in MCF7 xenograft. **Methods:** Human BC samples were sliced, cultivated and VD treated (24h). Affymetrix gene expression profile was obtained. Mammary epithelial model of cell transformation HME, HME^{LT}, HME^{LT+Ras} and also MCF7 cells (in vitro or xenograft) were used to follow-up VD regulated genes by qPCR, western blotting, confocal microscopy and ELISA assays. **Results:** Seven up-regulated genes were confirmed modulated (RT-qPCR analysis) in the cell transformation model after VD treatment (24h), including BMP6 and DPP4. Among them, CD14, IL1RL1 and SHE were also modulated in MCF7 cells. Despite constant levels of CD14 protein in all cells, a significant increase in sCD14 was seen. Conversely, detectable CA2 protein levels were present only in HME and HME^{LT} VD treated cells. **Conclusion:** Novel VD regulated genes were identified in this model, some of them probably influenced by the stromal compartment. Supported by FAPESP 2007/04799-2, CAPES, NIH CA69700.

Poster: 14th Vitamin D Workshop, October 4-8, Brugge, Belgium, 2009.
(Abstract number: 88)

HUMAN BREAST TUMOR SLICES: A MODEL FOR IDENTIFICATION OF VITAMIN D REGULATED GENES IN THE TUMOR MICROENVIRONMENT. C. Milani¹, J. Welsh², M.L.H. Katayama¹, E. Lyra³, M. Maciel⁴, M.M. Brentani¹, M.K. Folgueira¹; ¹Departamento de Radiologia, Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 01246903; ²Biomedical Sciences, School of Public Health, University at Albany, Rensselaer, USA, 12144; ³Instituto Brasileiro de Controle do Câncer, São Paulo, Brazil, 03102002; ⁴Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brazil, 01509010.

Background: While many studies have addressed the direct effects of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on breast cancer (BC) cells, the effects of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on stromal-epithelium interactions, which are known to be important for BC development, have been largely ignored. The aim of this study was to study the effects of physiological (0.5nM) and pharmacological (100nM) concentrations of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in the context of the tumor microenvironment using a breast cancer organ culture model. **Methods:** Freshly excised human BC tumor samples were sliced and cultivated in complete culture media containing vehicle, 0.5nM or 100nM $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ for 24 hours. Affymetrix gene expression profiles obtained in five separate tissue samples for each treatment were analysed with *GeneSpring GX Software*. Follow-up of candidate $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regulated genes will be achieved in other tumor slices group. **Results:** Under the conditions used, the human BC slices remained viable for at least 24 hours, and VDR gene expression was detected in all samples. Sensitivity to $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was verified through induction of CYP24 gene expression by 12 and 129 fold at 0.5nM and 100nM $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, respectively. Among 1,529 differentially expressed genes, several genes previously identified as VDR targets were found, including PHB, CD14, IL1RL1 and CLMN (two-way ANOVA, $p < 0.01$, FDR $p < 0.05$). Additional novel $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regulated genes identified included DPP4, CA2, SHE, and IL33. **Conclusion:** The vitamin D signaling pathway is functional in BC slices, a model which preserves stromal-epithelial interactions and mimics *in vivo* conditions. Several novel $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regulated genes were identified in this model which may represent biomarkers of vitamin D action in human breast cancer. Supported by FAPESP 2007/04799-2, CAPES and NIH CA69700.

Colaboração com a professora JoEllen Welsh no Gen*NY*Sis Center for Excellence in Cancer Genomics (University at Albany); Albany, EUA. Período: janeiro a junho de 2009.

Colaboração: publicação de artigo

The International Journal of Biological Markers, Vol. 23 no. 4, pp. 220-225
© 2008 Wichtig Editore

Expression of heterochromatin protein 1 in the primary tumor of breast cancer patients in the presence or absence of occult metastatic cells in the bone marrow

A.P.S. Abreu^{1,2}, C. Milani¹, M.L.H. Katayama¹, E.M. Barbosa², L. Gomes da Fonseca¹, J.C.S. Góes², M.M. Brentani¹, M.A.A. Koike Folgueira^{1,2}

¹Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Radiologia, Disciplina de Oncologia, São Paulo

²Instituto Brasileiro de Controle do Câncer de São Paulo, São Paulo - Brasil

ABSTRACT: Gene silencing may occur in breast cancer samples from patients presenting with occult metastatic cells in the bone marrow and one mechanism regulating gene suppression is heterochromatin formation. We have studied whether members of the heterochromatin protein 1 family (HP1^{H3α}, HP1^{H3β} and HP1^{H3γ}), which take part in chromatin packaging and gene expression regulation, were differentially expressed in tumors from patients with and without occult metastatic cells in their bone marrow. Tumor samples and bone marrow aspirates were obtained from 37 breast cancer patients. Median age was 63 years and 68% of the patients presented with clinical stage I/II disease. Presence of occult metastatic cells in bone marrow was detected through keratin-19 expression by nested RT-PCR in samples from 20 patients (54.1%). The presence of occult metastatic cells in bone marrow was not associated with node involvement, histological grade, estrogen receptor and ERBB2 immunoexpression. Relative gene expression of HP1^{H3α}, HP1^{H3β} and HP1^{H3γ} was determined by real-time RT-PCR and did not vary according to the presence of occult metastatic cells in bone marrow. In addition, the combined expression of these three transcripts could not be used to classify samples according to the presence of bone marrow micrometastasis. Our work indicates that regulation of heterochromatin formation through HP1 family members may not be the sole mechanism implicated in the metastatic process to the bone marrow. (Int J Biol Markers 2008; 23: 220-5)

Key words: Breast cancer, Bone marrow, Heterochromatin protein 1, Keratin, Occult metastatic cells, Reverse transcription-polymerase chain reaction

Resumos publicados em periódicos indexados

LYRA, E. C. ; Katayama, M. L.H. ; BOSSO, R.A. ; BRENTANI, M. M. ; MILANI, C. ; GOES, J. C. S. ; FOLGUEIRA, M. A. A. K. . Ki67 tumor expression in breast cancer post-menopausal patients following calcitriol supplementation. In: American Society of Clinical Oncology, 2008. J Clin Oncol, 2008. v. 26. p. 14612.

MILANI, C. ; ABREU, A. P. S. ; Katayama, M. L.H. ; NUNES, B. ; MACHADO, L. V. S. T. ; BRENTANI, M. M. ; FOLGUEIRA, M. A. A. K. . Detection of occult tumor cells in bone marrow aspirates and peripheral blood of breast cancer. In: 3º Simpósio Avanços em Pesquisas Médicas, 2007, São Paulo. Clinics, 2007. v. 62. p. 320.