Ticiana Thomazine Benvenuti

Influência de células epiteliais mamárias malignas na expressão gênica de células estromais originárias de linfonodo axilar comprometido ou não comprometido de pacientes com câncer de mama

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

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

São Paulo
2008

"Toda a nossa ciência, comparada
com a realidade, é primitiva e
infantil e, no entanto, é a coisa
mais preciosa que temos."

(Albert Einstein)

*Dedico este trabalho a todas pessoas que
lutam contra essa doença chamada câncer*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira, pelo seu exemplo de dedicação, por sua cautelosa orientação e por compartilhar comigo o seu conhecimento onde pude vivenciar a ciência, contribuindo para minha formação acadêmica. Pela sua atenção, apoio e palavras de força e encorajamento nos momentos difíceis.

À Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani, por sua brilhante maneira de conseguir despertar em todos nós um imenso interesse pela ciência e pela oportunidade de poder fazer parte do grupo de pesquisa em câncer de mama.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Hirata Katayama pelo privilégio de sua excelente envolvimento em todas as fases deste trabalho e, especialmente, pelo carinho e amizade no convívio diário.

Aos amigos Dra Rosângela Portilho Costa Santos, Cíntia Milani, Ana Paula Garey, Iran Amorim, Dra Renata Sobral, Suzana Honda, Mateus Barros Filho e Leonardo Fonseca, Leonardo K. Fugita, Simone Vieira da Costa, Paula Cravanzola e Larissa Chican pela colaboração em diversos momentos, pela amizade, apoio, carinho, compreensão e ajuda em todos esses anos de convivência e trabalho,

À Dra Patrícia Rozencham pela amizade, confiança e ensinamentos.

À Dra. Rosimeire Roela e Dra Shigueko Sonohara Pueyo por seus ensinamentos sobre cultura celular e contribuições em todas as etapas deste trabalho.

Ao Instituto Brasileiro de Controle do Câncer em nome do Dr. Eduardo Carneiro Lyra, pelo carinho com que cuida de suas pacientes e pela sua valiosa colaboração na coleta do material biológico utilizado neste trabalho.

À Profa. Dra. Mirian Hatsue Honda Federico e a todos do seu grupo de pesquisa em câncer de cabeça e pescoço, Simone Maistro, Fátima Solange Pasini, Cristina Campofiorito, Karen Brunialti, Bruno Ferencz Cadima, Lílían Pires Barbata por estarem sempre dispostos a ajudar e pelo convívio diário.

Aos amigos do Laboratório de adesão celular, Andréa Hanada Otake, Mara Souza Junqueira, Luciana Nogueira de Souza Andrade, Patrícia Luiza da Costa, Verônica Rodrigues Teixeira e Guilherme Francisco pela amizade e disposição a ajuda.

À Dra. Helena Brentani do Laboratório de Bioinformática do Instituto Ludwig de São Paulo pela realização das análises estatísticas dos dados de cDNA microarrays e integrantes de seu grupo César Henrique Torres e Luiz André Barreta pela paciência de minhas infindáveis dúvidas.

À Sra Maria José Benevides, por sua colaboração de todos os dias e carinho constante.

À Elizângela Dias, pelo carinho e dedicação e paciência com que sempre procura nos ajudar em todas as questões burocráticas da Secretaria de pós-graduação.

À Dra. Flávia Magone, pela formatação geral desta tese e pela grande amizade e carinho.

À Maria Cristina Grandal, por seu cuidado e dedicação artística em todas as ilustrações.

Aos Srs. Jair Cláudio, Willame Macedo e Ivonete Lima pelas brincadeiras que nos ajudam a relaxar e pela dedicação com que executam todo o seu trabalho.

A minha querida avó e aos meus amados pais Luigi Benvenuti e Márcia Thomazine, pelo amor, paciência, confiança e constante orientação e esforço pela minha educação e formação.

Ao meu amigo Yuri Keller Martins pelo apoio para realização dos meus objetivos e ao meu filho Pedro Henrique pelo entendimento da ausência e seu sorriso sempre me dando estímulo para vida.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de uma bolsa de pós-graduação. E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento deste projeto.

Agradeço a DEUS por tudo, principalmente pela saúde concedida, a qual foi fundamental para que conseguisse chegar até aqui!

Sumário

Lista de Abreviaturas	viii
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas.....	xv
Resumo	xviii
Abstract.....	xxi
1. Introdução	01
2. Objetivos	12
3. Casuística e Métodos	14
3.1 Casuística	15
3.2 Método	17
3.2.1 Cultura de célula.....	17
Banco de cultura primária de fibroblastos	17
Cultura primária de fibroblastos.....	17
Cultura de linhagem celular epitelial mamária	18
Co-cultura de fibroblastos e células epiteiais	20
3.2.2 Extração de mRNA.....	23
3.2.3 Reação de transcriptase reversa para obtenção de cDNA	24
3.2.4 Tecnologia do cDNA microarray	25
Análise matemática para seleção dos genes identificados como diferencialmente expressos por cDNA microarray	26
3.2.5 Confeção de Primers	28
3.2.6 Reação da Cadeia polimerase por transcriptase reversa quantitativo (qRT-PCR)	29
Genes constitutivos selecionados.....	34
Condições de reação de qRT-PCR	37

Análise estatística final	48
4. Resultados	49
4.1 Expressão gênica determinada por ensaio de cDNA microarray	50
4.1.1 Perfil de expressão gênica de fibroblasto de linfonodo não comprometido co-cultivado com MDA-MB231 em relação a fibroblastos de linfonodo não comprometido isolado [FN(-)/MDA vs FN(-)	50
4.1.2 Perfil de expressão gênica de fibroblasto de linfonodo comprometido co-cultivado com MDA-MB231 em relação a fibroblastos de linfonodo comprometido isolado [FN(-))/MDA vs FN(-).....	55
4.1.3 Genes modulados pela presença da célula MDA-MB231 em fibroblastos de linfonodo comprometido e não comprometido exclusivamente ou concomitantemente	61
4.2 Comparação da expressão gênica resultante de duas análises estatísticas (testeT e ANOVA) originadas de dados de cDNA microarray para escolha dos genes candidatos para análise por qRT-PCR.....	64
4.3 Análise da expressão gênica em fibroblastos de linfonodo por RT- PCR em tempo real (qRT-PCR)	68
5. Discussão	72
6. Conclusões	86
7. Anexo.....	88
8. Referências.....	114
Apêndice	

LISTA DE ABREVIATURAS

Lista de Abreviaturas

ATCC	– do Inglês <i>American Type Culture Collection</i>
Ca	– carcinoma
cDNA	– DNA complementar
cm ²	– centímetros cúbicos
CO ₂	– Dióxido de carbono
°C	– graus Celsius
Cy3-dCTP	– 5-Amino-propargyl-2'-deoxycytina5'- trifosfato acoplado a corante fluorescente Cy3 (verde)
Cy5-dCTP	– 5-Amino-propargyl-2'-deoxycytina5'- trifosfato acoplado a corante fluorescente Cy5 (vermelho)
DEPEC	– dietilpirocarbonato
DMEM	– meio Dubelcco's Modified Eagle's
DMSO	– dimetilsulfóxido
DNA	– ácido desoxirribonucléico
dNTP	– desoxiribonucleotídeos
DTT	– ditiotreitól
EGF	– fator de crescimento epidérmico
EMA	– antígeno de membrana epitelial
ER	– receptor de estrógeno
ErbB2	– homolog 2 do oncogene viral de leucemia eritroblástica
f	– do inglês <i>fold</i>
FGF	– fator de crescimento de fibroblasto
FN(+)	– fibroblasto de linfonodo axilar comprometido
FN(-)	– fibroblasto de linfonodo axilar não comprometido
FN(+)/MDA	– fibroblasto de linfonodo axilar comprometido co-cultivado com a célula MDA-MB213
FN(-)/MDA	– fibroblasto de linfonodo axilar não comprometido co-cultivado com a célula MDA-MB213
g	– força da gravidade (aceleração centrípeta)
Hb4a	– linhagem celular epitelial mamária humana derivada de mamoplastia imortalizada pela transfecção do antígeno T grande do vírus SV40
HGF	– fator de crescimento de hepatócito
IGF-I	– fator de crescimento insulina-símile-1
M	– molar

MCF-7	– linhagem celular epitelial mamária humana bem diferenciada derivada de infusão pleural de adenocarcinoma
MCF-10A	– linhagem celular epitelial mamária humana não tumorigênica
MDA-MB231	– linhagem celular epitelial mamária humana derivada de infusão pleural de adenocarcinoma
MDA-MB435	– linhagem celular epitelial mamária humana derivada de efusão pericardica
MDA-MB436	– linhagem celular epitelial mamária humana metastática
mg	– miligrama
ml	– mililitro
mM	– milimolar
MMP-9	– metaloprotease da matriz do tipo 9
NbF-1	– linhagem de fibroblastos de próstata de rato
ng	– nanogramas
nm	– nanometro
ORESTES	– do Inglês <i>Open Reading Frame Expressed sequence Tags</i>
pb	– pares de bases
PDGF- α	– fator de crescimento derivado de plaqueta – alfa
PMP22	– codifica proteína 22 da mielina periférica
PR	– receptor de progesterona
qRT-PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA	– ácido ribonucléico
RNA _m	– ácido ribonucléico mensageiro
rNTP	– ácido ribonucléico ribossomal
RPMI	– meio de cultura do Roswell Park Memorial Institute
RT	– enzima Transcriptase Reversa
TGF- β	– fator de crescimento transformante beta
TGF- β	– fator de crescimento transformante alfa
TNM	– Tumor, Node and Metastatic
UI	– Unidade internacional
UICC	– International Union Against Cancer
μ g	– microgramas
μ l	– microlitros
μ M	– micromolar

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras

- Figura 01.**Fenótipo da célula metastática. Identificação de uma célula com características híbridas entre a célula epitelial e mesenquimal.....**06**
- Figura 02.**Monocamada de fibroblastos de linfonodo comprometido de pacientes com câncer de mama em co-cultura com células epiteliais mamárias MDA-MB231**22**
- Figura 03.**Fotografia de gel de agarose demonstrando as bandas 18s e 28s de 6 amostras de fibroblastos de linfonodo.....**24**
- Figura 04.**Gráfico de amplificação quantitativa em qRT-PCR.....**30**
- Figura 05.**Metodologia do SYBR Green I onde o fluorocromo se intercala a qualquer molécula de dupla fita presente na reação.....**32**
- Figura 06.**Gráfico que mostra Curva de desnaturação apresentando um único pico de T_m, resultante de um único produto, mostrando assim a especificidade da reação**39**
- Figura 07.**Demonstração da curva de eficiência do realizado pelo sistema operacional Rotor Gene™ (Austrália).....**40**
- Figura 08.**Grau de estabilidade calculado pelo programa GeNorm para todos genes normalizadores candidato.....**43**
- Figura 09.**Análise de Agrupamento Hierárquico não supervisionado de 3 amostras de fibroblastos derivados de linfonodos não comprometidos [FN(-)] de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB-231), e de 3 amostras de fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos em cultura isoladamente. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoeexpressos (verde).....**52/53**
- Figura 10.**Análise de Agrupamento Hierárquico não supervisionado de 3 amostras de fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos [FN(+)] de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB-231 e de 3 amostras de fibroblastos de linfonodos
-

não comprometidos mantidos em cultura isoladamente. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos(verde).....**57/58**

Figura 11.Diagramas de Venn A: Número de genes diferencialmente expressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos [FN(+)] e não comprometidos [FN(-)] em co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB231) quando comparados aos fibroblastos de linfonodo comprometido mantidos isolados [FN(+)]MDA/FN(+)] ou não comprometido mantidos isolados [FN(-)]MDA/FN(-)]. Os genes comumente modulados podem ser visto na área de intersecção.....**61**

Figura 12.Diagramas de Venn B: Número de genes hipoexpressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos [FN(+)] e não comprometidos [FN(-)] em co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB231) quando comparados aos fibroblastos de linfonodo comprometido mantidos isolados [FN(+)]MDA/FN(+)] ou não comprometido mantidos isolados [FN(-)]MDA/FN(-)]. C: Número de genes hiperexpressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos [FN(+)] e não comprometidos [FN(-)] em co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB231) quando comparados aos fibroblastos de linfonodo comprometido mantidos isolados [FN(+)]MDA/FN(+)] ou não comprometido mantidos isolados [FN(-)]MDA/FN(-)]. Os genes comumente modulados podem ser visto na área de intersecção.....**63**

Figura 13.Análise de Agrupamento Hierárquico não supervisionado de 3 amostras de fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB-231), e de 3 amostras de fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos em cultura isoladamente. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).....**67**

- Figura 14.** Valores médios e erros padrões da expressão relativa de AKAP8L em fibroblastos de linfonodo não comprometido [FN(-)] em monocultura ou em co-cultura com MDA-MB231[FN(-)/MDA231], MDA-MB435 FN(-)/MDA435 e MCF-7 FN(-)/MCF-7 e fibroblasto de linfonodo comprometido [FN(+)] em monocultura ou em co-cultura com MDA-MB231 [FN(+)/MDA231], MDA-MB435 [FN(+)/MDA435] e MCF-7 [FN(+)/MCF-7] **69**
- Figura 15.** Gráfico com valores médios e erros padrões da expressão relativa de CREG1 em fibroblastos de linfonodo não comprometido [FN(-)] em monocultura ou em co-cultura com MDA-MB231[FN(-)/MDA231], MDA-MB435 FN(-)/MDA435 e MCF-7 FN(-)/MCF-7 e fibroblasto de linfonodo comprometido [FN(+)] em monocultura ou em co-cultura com MDA-MB231 [FN(+)/MDA231], MDA-MB435 [FN(+)/MDA435] e MCF-7 [FN(+)/MCF-7] **70**
- Figura 16.** Gráfico com valores médios e erros padrões da expressão relativa de MAP2K3 em fibroblastos de linfonodo não comprometido [FN(-)] em monocultura ou em co-cultura com MDA-MB231[FN(-)/MDA231], MDA-MB435 FN(-)/MDA435 e MCF-7 FN(-)/MCF-7 e fibroblasto de linfonodo comprometido [FN(+)] em monocultura ou em co-cultura com MDA-MB231 [FN(+)/MDA231], MDA-MB435 [FN(+)/MDA435] e MCF-7 [FN(+)/MCF-7]. **70**
-

LISTA DE TABELAS

Lista de Tabelas

Tabela 01. Dados sobre as pacientes com câncer de mama que foram recrutadas para este estudo	16
Tabela 02. Descrição dos oligonucleotídeo utilizados	29
Tabela 03. Temperatura de fusão de cada primer	39
Tabela 04. Eficiência e slope da reação de cada primers utilizados em reação de qRT-PCR e cálculo da eficiência da reação pelo slope	40
Tabela 05. Valores de M e Fator de normalização gerada pelo programa Genorm com seis genes constitutivos em 20 amostras de co-cultura e isolados (de fibroblastos de linfonodo axilar de pacientes com câncer de mama comprometidos e não comprometidos), tendo com amostras referência HB4a	44
Tabela 06. Valores de M e Fator de normalização gerada pelo programa Genorm com seis genes constitutivos em 20 amostras de co-cultura e isolados (de fibroblastos de linfonodo axilar de pacientes com câncer de mama comprometidos e não comprometidos), tendo com amostras referência MDA-MB231	45
Tabela 07. Valores de M e Fator de normalização gerada pelo programa Genorm com seis genes constitutivos em 20 amostras de co-cultura e isolados (de fibroblastos de linfonodo axilar de pacientes com câncer de mama comprometidos e não comprometidos), tendo com amostras referência pool de fibroblastos.....	46
Tabela 08. Genes hiperexpressos ou hipoexpressos em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivado com MDA-MB231 em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos	54
Tabela 09. Funções biológicas reguladas em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivado com MDA-MB231 em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos [FN(-)/MDA vs FN(-)] onde ao menos dois genes envolvidos estavam representados na lâmina de cDNA microarray (Referência $\geq$ 2) ($p\leq 0,05$, Onto-Express)	55

Tabela 10. Genes hiperexpressos ou hipoexpressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos co-cultivado com MDA-MB231 em relação a fibroblastos de linfonodos comprometidos	59
Tabela 11. Funções biológicas reguladas em fibroblastos de linfonodos comprometidos co-cultivado com MDA-MB231 em relação a fibroblastos de linfonodos comprometidos [FN(+)/MDA vs FN(+)] onde ao menos dois genes envolvidos estavam representados na lâmina de cDNA microarray (Referência $\geq$ 2) ($p\leq 0,05$, Onto-Express).....	60
Tabela 12. Genes diferencialmente expressos em fibroblastos co-culturado com célula epitelial maligna identificado pelo teste ANOVA ou teste T pareado	66

RESUMO

Benvenuti TT. *Influência das células epiteliais mamárias malignas na expressão gênica de células estromais originárias de linfonodo axilar comprometido ou não comprometido de pacientes com câncer de mama* São Paulo [Tese]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2008.

O desenvolvimento da metástase depende, entre outros fatores de um microambiente propício e é possível que as células do câncer de mama influenciem o perfil da expressão gênica das células estromais, tanto no tumor primário como no linfonodo regional. Para estudar este último evento obtivemos fibroblastos de linfonodos comprometidos (n=3) ou não (n=3) de pacientes com câncer de mama, os quais foram co-cultivados com células de câncer de mama MDA-MB-231, separados fisicamente por membranas porosas por 72 horas. O perfil da expressão gênica foi determinado utilizando-se uma plataforma de cDNA microarray. A presença de células MDA-MB231 modulou a expressão de 415 genes em fibroblastos de linfonodos não comprometidos e 779 genes em fibroblastos de linfonodos comprometidos, em relação a células mantidas em mono-cultura, sendo que 120 genes tiveram sua expressão reguladas em ambas comparações. A expressão destes genes determinou a separação dos fibroblastos mantidos em co-cultura daqueles mantidos isoladamente em cultura por análise de agrupamento hierárquico, indicando que a presença das células de câncer de mama influencia o perfil da expressão gênica das células. Entre as funções reguladas pela presença de células MDA-MB231 encontram-se tradução e receptor de superfície ligado à transmissão de sinal, em fibroblastos de linfonodos não comprometidos e autofosforilação de proteína e ciclo celular, em fibroblastos de linfonodos comprometidos. Para determinar se a expressão gênica diferencial é um fenômeno que pode ser generalizado para

o câncer de mama, realizamos ensaios utilizando outras amostras de fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos de 5 pacientes e de linfonodos não comprometidos de outras 5 pacientes (incluindo as 6 amostras de fibroblastos previamente analisadas), as quais foram co-cultivadas com três linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB231, MDA-MB435 e MCF-7). A expressão relativa de MAP2K3, AKAP8L e CREG1, inicialmente identificados como diferencialmente expressos em análise de cDNA microarray, foi então determinada por RT-PCR em tempo real. Observamos que nenhuma das três linhagens celulares influenciou a expressão de AKAP8L e CREG1 tanto em fibroblastos de linfonodos comprometidos quanto não comprometidos. MAP2K3 foi hiperexpresso tanto em fibroblastos de linfonodos comprometidos quanto em não comprometidos co-cultivados com células MDA-MB231, mas não com células MDA-MB435 ou MCF-7. Nossos resultados indicam que a presença de células MDA-MB231 influencia o perfil de expressão gênica de fibroblastos originário tanto de linfonodos comprometidos quanto de não comprometidos. Alguns genes comumente regulados em fibroblastos de linfonodo comprometido ou não comprometidos, incluindo MAP2K3, podem estar envolvidos no estabelecimento de metástase regional.

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

ABSTRACT

Benvenuti TT. *Influence of malignant mammary epithelial cells in gene expression of stromal cells from involved or uninvolved lymph nodes from breast cancer patients*. [Thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008.

Metastasis development may depend on a favorable microenvironment and breast cancer cells may influence stromal cells gene expression profile not only in the primary site but also in the lymph nodes. To study the latter event, fibroblasts were obtained from involved or uninvolved lymph nodes from six breast cancer patients and co-cultivated with breast cancer MDA-MB-231 cells, physically separated by porous membranes, for 72 hours. The gene expression profile was determined utilizing a cDNA microarray platform. The presence of MDA-MB231 cells modulated the expression of 415 genes in fibroblasts from uninvolved nodes and 779 genes in fibroblasts from involved nodes, as compared to fibroblasts cultured isolated, including 120 genes, which were regulated in fibroblasts from both origins. Unsupervised hierarchical clustering allowed a correct segregation of fibroblasts co-cultured with MDA-MB231 cells from fibroblasts cultured alone, indicating that the gene expression profile gene is influenced by the presence of breast cancer cells. Functions, which were regulated by presence of MDA-MB231 cells included translation and cell surface receptor linked signal transduction in fibroblasts from uninvolved nodes and protein autophosphorylation and cell cycle in fibroblasts from involved nodes. To determine whether this differential gene expression was a general process influenced by breast cancer cells, further assays were performed utilizing samples of fibroblasts from involved (n=5) and uninvolved nodes (n=5) from breast cancer patients (including the 6 samples of fibroblasts previously

analyzed), which were co-cultured with three breast cancer cell lines (MDA-MB231, MDA-MB435 and MCF-7). Relative expression of MAP2K3, AKAP8L and CREG1, initially identified as differentially expressed in co-cultured fibroblasts upon cDNA microarray analysis, was determined by RT-PCR real time. AKAP8L and CREG1 expression in fibroblasts from involved or uninvolved nodes was not influenced by the presence of any of the three cell lines. MAP2K3 was over-expressed in fibroblasts from both involved and uninvolved nodes when co-cultured with MDA-MB231 cells, but not with MDA-MB435 or MCF-7 cells. Our results indicate that the gene expression profile of fibroblasts from involved and uninvolved lymph nodes are influenced by the presence of MDA-MB231. Some genes commonly regulated in fibroblasts from both involved and uninvolved nodes, as MAP2K3, may be involved in regional metastasis establishment.

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

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, apontam para ocorrência de 466.730 casos novos de câncer, sendo 49.400 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 68 casos novos por 100 mil (INCA, 2007). Apesar de ser considerado um câncer de relativo bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados.

O parênquima mamário é constituído de ácinos e um lúmen central composto por uma contínua camada de células epiteliais luminais, as quais são envoltas por uma camada de células mioepiteliais. Essa estrutura de dupla camada é encerrada na membrana basal. A matriz extracelular fornece sustentação estrutural e informação contextual. E este mesmo macroambiente orienta as células epiteliais a estabelecerem as extremidades apical e basal numa superfície intacta e polarizada que mantém o seu estado diferenciado, sendo o contato físico adquirido através da combinação de diversas formas de junções (Bissel *et al.*, 2002; 2001; Cotran *et al.*, 1999).

No desenvolvimento e remodelamento mamário, assim como na origem e progressão do câncer de mama, há a participação de diversos fatores, como hormônios, fatores de crescimento, citocinas, moléculas de matriz extracelular e metaloproteases de matriz (Bissel & Radisky, 2001).

Caracteriza-se o desenvolvimento do tumor como um processo de múltiplos passos, cuja iniciação e promoção envolvem etapas no qual o DNA acumula uma série de lesões, levando a célula a perder seu controle da proliferação, diferenciação, apoptose e reparo de DNA (FARBER *et al.*, 1984; Volgestein *et al.*, 1993). O processo de oncogênese resultante dessas alterações genéticas culmina com o crescimento de sucessivas populações (ou clones celulares) conferindo heterogeneidade ao tumor que contribui para que seja mais ou menos agressivo (Ferreira & Rocha (2004) citado por Silva *et al.* 2004; Micke & Ostman, 2004). Uma das hipóteses é de que tais alterações modificam as células normais que sucessivamente se transformam em células hiperplásicas, que por sua vez adquirem formas atípicas, a seguir transformam-se em carcinoma *in situ* e finalmente carcinoma invasor (Kang *et al.*, 2004). Os tipos histológicos mais comuns de câncer de mama são os carcinomas ductais infiltrativos (aproximadamente 70-80%) e carcinomas lobulares infiltrativos (aproximadamente 10%) sendo que essa classificação histológica tem menor significância prognóstica se comparado ao grau tumoral baseados em padrões morfológicos, pleomorfismo nuclear e contagem de mitoses (Fitzgibbons *et al.*, 2000).

O processo de carcinogênese representa a perda de equilíbrio entre proliferação e morte celular, onde as células passam a proliferar de forma anômala, formando uma massa de células desordenadas que constituem o tumor primário. As células tumorais são capazes de se dividir na ausência de sinais positivos para a proliferação e apresentam morfologia e comportamento alterados. Durante este processo, algumas destas células perdem a

capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem por meio da produção de enzimas proteolíticas, atravessam a parede dos vasos sanguíneos ou linfáticos, caem na circulação, se instalam em outros tecidos, onde proliferam, caracterizando então o processo metastático (Ferreira (2004) citado por Parmigiani & Camargo 2004; Sloan & Anderson, 2002; Sahai, 2007). Aproximadamente 90% de todas as mortes por câncer se devem à formação de metástase (Cavallaro & Christofori, 2004).

O processo de metástase ocorre também em várias etapas. O primeiro passo é a perda da adesão célula-célula e o ganho de motilidade que permite à célula invadir o tecido adjacente. O segundo passo ocorre quando a célula tumoral penetra através do endotélio do vaso sanguíneo ou do ducto linfático e entra no sistema circulatório ou por extensão direta (Sherman & Hossfeld, 1990). Somente algumas células são capazes de sobreviver a este processo e completam o processo de metastatização saindo do sistema circulatório, depositando-se em outro sítio e proliferando-se a seguir (Yang *et al.*, 2004). A formação da metástase ocorre somente quando a célula e o microambiente são compatíveis (Fidler, 2003; Sohara *et al.*, 2005).

A alta mortalidade associada ao câncer de mama deve-se ao fato descrito acima, onde a célula cancerosa pode invadir tecidos adjacentes, disseminar-se localmente para linfonodos e ainda por via hematogênica para órgãos à distância invadindo e colonizando outros tecidos, preferencialmente fígado, cérebro, ossos e pulmões. (Lakhani *et al.*, 1999). A metástase representa a mais importante adversidade na progressão do carcinoma mamário, sendo que o comprometimento linfonodal é considerado o mais

confiável fator preditivo para um pior prognóstico, incluindo recorrência precoce e curto período de sobrevida.

Tanto o tamanho do tumor primário quanto a presença de envolvimento linfonodal são fatores prognósticos de valor independente. O tamanho crescente do tumor está associado com maior propensão de comprometimento nodal. A sobrevida em 10 anos de pacientes com câncer de mama em estágio I é de 78,7%, em estágio II de 64,6% e em estágio III de 33,3%, confirmando o prognóstico sombrio de pacientes com doença avançada (Yang *et al.*, 2004). Além disso, uma forte correlação existe entre o envolvimento linfonodal e a presença de metástase à distância. Por outro lado, cerca de 20 a 30% das pacientes com linfonodos axilares considerados livres de doença, desenvolvem metástase à distância após 10 anos (Hellman & Harris, 2000; Clark, 2000). Estes fatos sugerem que os linfonodos considerados negativos apresentavam doença que não foi originalmente detectada ou ainda que a metástase pode migrar pela corrente sanguínea sem envolver linfonodos regionais.

Os linfonodos são órgãos encapsulados constituídos por tecido linfóide e que aparecem espalhados pelo corpo, sempre no trajeto de vasos linfáticos. A linfa antes de atingir a corrente sanguínea, passa pelos linfonodos satélites e regionais, os quais são filtros de linfa. Os cânceres têm a capacidade de metastatizar principalmente para estes linfonodos, como por exemplo, o linfonodo axilar nos casos de câncer de mama (Junqueira & Carneiro, 1995). Acredita-se que as células que compõem o microambiente linfonodal podem exercer influência no perfil da expressão gênica das células cancerosas que o

comprometem, induzindo ou inibindo o desenvolvimento da metástase regional (Hasebe *et al.*, 2000).

Embora existam dados mostrando que as alterações encontradas nas interações entre o tumor e o estroma possuem um papel fundamental na determinação de que a célula tumoral permanecerá dormente ou se tornará invasiva, não está bem esclarecido se as alterações patológicas na matriz extracelular também podem contribuir para a dormência ou disseminação da célula tumoral *in vivo*. Todavia, as interações entre o estroma e o tumor podem regular eventos chaves na cascata metastática *in vitro* e *in vivo* (Bemis & Schedin, 2000).

Figura 1 – Fenótipo da célula metastática. Identificação de características híbridas entre células epiteliais e mesenquimais

Modificado de Lee *et al* (2006)

Inúmeros trabalhos foram realizados na tentativa de se determinar os fatores responsáveis pela diferença de comportamento do tumor e grande ênfase foi dado no estudo das células epiteliais transformadas, porém o papel das células mesenquimais no desenvolvimento tumoral e no processo metastático ainda é pouco claro.

Um método para se avaliar as interações funcionais entre células epiteliais e fibroblastos são as co-culturas. Dong-Le Bourhis *et al.* (1997) relatam que fibroblastos oriundos de tecido mamário normal inibem a proliferação de células de câncer de mama MCF-7, mas não o de células mamárias imortalizadas e que fibroblastos obtidos de tecido mamário canceroso não influenciam a proliferação destas duas linhagens epiteliais mamárias. Por outro lado, Shekhar *et al.* (2001), mostraram que fibroblastos normais derivados de mamoplastia inibem o crescimento de linhagens epiteliais mamárias normais, enquanto fibroblastos provenientes de câncer de mama induzem o seu crescimento. De acordo com este segundo relato, Lefebvre *et al.* (1995), demonstraram uma maior proliferação de linhagens de câncer de mama, mas o mesmo não ocorreu com as células epiteliais normais. Nestes trabalhos, pequenas diferenças relativas ao modo de co-cultura podem ter originado estas diferenças no comportamento celular. Enquanto Dong-Le Bourhis *et al.* (1997), cultivaram os fibroblastos e as células epiteliais separados por membrana porosa, o que permite a passagem de substâncias solúveis, mas elimina o contato direto entre elas. Shekhar *et al.* (2001) e Lefebvre *et al.* (1995) cultivaram as células em contato íntimo.

Outra hipótese é que os fibroblastos promovam a invasão das células do

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

Em outro modelo de co-culturas observou-se que somente algumas linhagens de câncer mamário têm a capacidade de invadir o esferóide de fibroblastos, fossem eles originados da pele ou do tumor. Além disso, demonstrou-se que fibroblastos obtidos de tumor apresentam características de miofibroblastos. Por outro lado, observou-se também que fibroblastos normais co-cultivados com células epiteliais tumorais, apresentam menor expressão de RNAm de PMP22, que codifica uma proteína cuja expressão em fibroblastos correlaciona-se a parada de proliferação em G0. Esta foi identificada como a primeira molécula com papel potencial na interação heteróloga entre células tumorais e fibroblastos normais (Kunz-Shughart *et al.*, 2001).

Em estudos animais, Camps *et al.* (1990) sugerem que a presença de fibroblastos é importante para o desenvolvimento do tumor ao mostrar que fibroblastos de próstata de rato, NbF-1, inoculados com células epiteliais, entre elas células de câncer de mama humano MDA-MB436, em camundongos imunossuprimidos, levam à formação de tumores, o que não acontece quando as células epiteliais são injetadas isoladamente. Outros autores demonstraram ainda que a injeção concomitante de células epiteliais malignas e fibroblastos senescentes em camundongos levaram à formação de tumores, fato que pode ser atribuído à ação parácrina de fatores de crescimento secretados pelos

fibroblastos (Krtolica *et al.*, 2001). Em estudo, Kuperwasser *et al.* (2004) mostraram por sua vez que fibroblastos transformados que hiperexpressam fatores de crescimento como TGF β e/ou HGF induzem a formação de tumores em camundongos imunossuprimidos, a partir da injeção de células epiteliais mamárias oriundas de mamoplastia. Estes dados sugerem que estes fibroblastos estimulam o desenvolvimento de células epiteliais neoplásicas ocultas (presentes no tecido mamário normal) em células malignas.

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

As células estromais presentes em linfonodo também podem representar um papel significativo durante o processo de disseminação regional da doença. Um dos poucos trabalhos que investigam esse aspecto foi de LeBedis *et al.* (2002) que realizaram cultura de células estromais obtidas de linfonodo de rato e observaram que o meio condicionado causa um aumento na proliferação de linhagens celulares de câncer de mama. Estes autores detectaram que estas células estromais apresentavam transcritos de vários fatores de crescimento como IGF-I, EGF, HGF e PDGF- α . Além disso, estudo de Montel *et al.* (2006) indicou que microambiente linfonodal regula a expressão de alguns genes de células do câncer de mama em modelo xenogênico.

Estudo prévio de nosso grupo avaliou o perfil gênico de fibroblastos de linfonodos comprometidos e não comprometidos obtidos de pacientes com câncer de mama. Observou-se que fibroblastos de linfonodos comprometidos e não comprometidos têm expressão gênica muito semelhante, mas alguns genes são diferencialmente expressos. O perfil gênico foi analisado usando-se uma lâmina de cDNA microarray. (Santos, 2006).

No presente estudo nosso objetivo foi determinar se em fibroblastos de linfonodo comprometido e não comprometido de pacientes com câncer de mama a regulação da expressão de alguns genes pode ser exercida por células de câncer de mama em geral. Para isso os fibroblastos foram co-cultivados na presença de três linhagens MDA-MB231, MDA-MB435 e MCF-7.

A linhagem celular epitelial MCF-7 é originária de efusão pleural de uma paciente caucasiana de 69 anos com adenocarcinoma de mama. Estas células apresentam receptores de estrógeno e progesterona, E-caderina, zona ocludens, desmoplakin I/II, mas não apresenta vimentina e caderina-11. Esta linhagem tem morfologia fusiforme e são consideradas luminais, além disso, são células com baixo grau de invasão em matrigel (Sommers *et al.*, 1994; Pishvarian *et al.*, 1999; Lacroix *et al.*, 2004).

A linhagem celular epitelial MDA-MB435 é originada de efusão pericárdica de uma paciente caucasiana de 48 anos com carcinoma de mama. Esta célula não expressa receptores hormonais, E-caderina e caderina -11, mas apresenta amplificação de erbB2, expressa fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e vimentina. Esta linhagem tem morfologia estrelada e é considerada célula epitelial mesenquimal, ale disso tem alto grau de invasão

em matrigel, mas não é tumorigênica em ratos imunossuprimidos (Pishvarian *et al.*, 1999; Lacroix *et al.*, 2004).

A linhagem celular epitelial MDA-MB231 é originada de efusão pleural de uma paciente caucasiana de 51 anos com adenocarcinoma de mama. Esta células não expressa receptor de estrógeno, progesterona e E-caderina, mas expressa vimentina e caderina-11 (tanto o tipo selvagem como a variante), receptor para fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento transformante alfa (TGF-alfa). Esta linhagem de morfologia estrelada é considerada célula epitelial mesenquimal, além disso em ratos imunossuprimidos a injeção dessa célula é capaz de causar adenocarcinoma pobremente diferenciado de grau III. (Lacroix *et al.*, 2004, Pishvarian *et al.*, 1999; Feltes *et al.*, 2002).

OBJETIVOS

2.1-Objetivo Geral

Avaliar a influência de linhagens de câncer de mama na expressão de alguns genes em fibroblastos de linfonodo comprometido ou não comprometido de pacientes com câncer de mama.

2.2- Objetivo Específico

1. Realizar cultura de fibroblastos de linfonodo de 5 pacientes de câncer de mama e linfonodo axilar comprometido e outras 5 pacientes com câncer de mama e linfonodo axilar não comprometido em 3 passagens.

2. Realizar co-culturas de fibroblastos provenientes de linfonodos comprometidos (n=5) ou não comprometidos (n=5) com células epiteliais mamárias malignas MDA-MB231, MDA-MB435 e MCF-7.

3. Analisar por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) a expressão gênica de alguns transcritos em fibroblastos de linfonodo de pacientes com câncer de mama.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) (Protocolo N° 368/03).

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados fibroblastos de cultura primária de linfonodo de pacientes com câncer de mama. Esse banco de fibroblastos foi estabelecido pela Dra Rosângela P. C. Santos. Foram coletadas amostras de linfonodo axilar de pacientes submetidas à mastectomia ou ressecção conservadora da mama, acompanhadas de linfadenectomia, após a obtenção do consentimento livre e esclarecido das mesmas, durante o período de dezembro de 2002 a maio de 2004. Foi realizada análise histopatológica das amostras de linfonodo incluídas neste estudo a qual confirmou o comprometimento ou não comprometimento dos linfonodos. O estadiamento clínico destas pacientes foi realizado baseando-se no sistema TNM-2002 (Tumor/Nódulo/Metástase), criado pela UICC (Union Internationale contre le Cancer) e pela AJCC (American Joint Committee on Cancer). Tal sistema agrupa diversos tipos tumorais de acordo com as seguintes características: 1- T = tamanho do tumor, 2 – N = envolvimento do nódulo e 3 – M = Ocorrência de metástase à distância do tumor primário.

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

estes últimos provenientes de pacientes nas quais todos os linfonodos dissecados foram considerados negativos ao exame histopatológico da peça cirúrgica. As características das pacientes estão resumidas na tabela abaixo.

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

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

3.2- Métodos

3.2.1- Cultura de Células

Banco de célula de cultura primária de fibroblastos

Realizou-se cultura primária de fibroblastos obtidos de linfonodo axilar humano de pacientes com câncer de mama, pela Dra Rosângela P. C. Santos pelo método de explante, e após a terceira passagem observou-se uma cultura homogênea de fibroblastos, verificada pela expressão positiva de vimentina e actina de músculo liso, marcadores específicos para fibroblastos, mas não de citoqueratina, os quais foram posteriormente congelados e armazenados em nitrogênio líquido. Foi armazenado neste banco de célula fibroblastos derivados de cultura primária oriunda de linfonodos axilares de pacientes com câncer de mama comprometidos e não comprometidos.

Cultura primária de fibroblastos

O descongelamento celular foi o primeiro passo para obtermos a cultura primária. Primeiramente centrifugou-se a ampola até então parcialmente descongelada a 2000 x g. por 2 minutos, em seguida aspirou-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspendido para lavagem com 10mL do meio de cultura propício para cada tipo celular, logo centrifugou-se novamente a 2000 x g por 2 minutos. Após a retirada do sobrenadante ressuspendeu-se o precipitado (célula) com o meio de cultura apropriado e transferiu-se para uma garrafa de cultura com 75 cm² de área (Corning Incorporated, NY, USA),

usando um volume de 10 ml de meio de cultura DMEM (Dulbecco's) (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco), 100 µg/ml de ampicilina (Furp, Guarulhos, Brasil), 100 µg/ml de estreptomicina (Furp) e 2,5 µg/ml de anfotericina B (Cristália, São Paulo, Brasil). As células foram mantidas em estufa a 37°C e em atmosfera constante de 5% de CO₂, sendo o meio trocado por aproximadamente 5 dias e tripsinizadas quando necessário para sua expansão e ou congelamento, usando para cada ampola de 2ml contendo 95% de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco) e 5% de DMSO (Dimetilsulfóxido) (SIGMA, Saint Louis, USA) para um total de 10⁶ células, com viabilidade acima de 95%. Estas ampolas foram estocadas por 24 horas em sistema para congelamento Nalgene™ Cryo (Nalgene Inc, USA) em freezer a -70°C e depois transferidas para um container de nitrogênio líquido, onde permaneceram até o uso. Os fibroblastos usados nos ensaios de co-cultura e qRT-PCR foram somente aqueles que se encontravam entre a terceira e a décima quinta passagem de cultura celular, sendo que a passagem celular é contada a cada tripsinização.

Cultura de linhagem celular Epitelial Mamária

As células epiteliais mamárias humanas normais HB4a (utilizadas como uma das referências para realização de Reação Polimerização em Cadeia com Transcriptase Reversa Quantitativo, qRT-PCR), foram doadas pelos Drs. Michael J. O'Hare e Alan McKay do Ludwig Institute for Cancer Research, Londres, Reino Unido. Esta linhagem é proveniente de tecido mamário de mamoplastia onde células epiteliais foram selecionadas utilizando-se anticorpo

contra antígeno de membrana epitelial (EMA). Estas células apresentam um fenótipo não transformado e expressam citoqueratina 18 e 19, que são típicas de células luminais e foram imortalizadas pela transfecção do gene de antígeno T grande de vírus SV40 (O'Hare *et al.*, 1991; Stamps *et al.*, 1994). O meio de cultura utilizado para o cultivo destas células foi RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco), 5 µg/ml de insulina bovina (Sigma), 5 µg/ml de hidrocortisona (Sigma), 0,05µg/ml de sulfato de gentamicina (Novafarma, Goiás, Brasil) e 100µg/ml de ampicilina (Furp), mantidas em estufa a 37°C em atmosfera constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific, Arietta, Ohio, EUA).

As células epiteliais de câncer de mama MCF-7 (utilizadas para realização de co-cultura com fibroblastos de linfonodo) foram adquiridas da ATCC (American Type Culture Collection) (HTB-22) e cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) acrescido com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco), 50µg/ml de ampicilina (Furp) e 100µg/ml de estreptomicina (Furp), mantidas em estufa a 37°C em atmosfera constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific).

As células epiteliais de câncer de mama com potencial metastático MDA-MB-231 foram adquirida da ATCC (American Type Culture Collection) (HTB26) (co-cultivadas com fibroblastos de linfonodo e utilizadas como referência nas reações de qRT-PCR). Essa linhagem foi cultivada em meio de cultura Leibovitz's L-15 (Gibco) com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco), 100µg/ml de ampicilina (Furp) e 100µg/ml de estreptomicina (Furp), mantidas em estufa a 37°C na ausência de CO₂ (Forma Scientific).

As células epiteliais mamárias humanas MDA-MB-435 (utilizadas para realização de co-cultura) foram cedida pelo Dr Robert Whitehead (Vanderbilt University Medical Center). Seu cultivo foi em meio RPMI 1640 (Gibco) acrescido com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco), 100µg/ml de ampicilina (Furp) e 100µg/ml de estreptomicina (Furp). Foram mantidas em estufa a 37°C na ausência de CO₂ (Forma Scientific).

Co-culturas de fibroblastos e células epiteliais

Os ensaios de co-cultura com os fibroblastos (oriundos de linfonodo axilar de mulheres com câncer de mama) e células epiteliais (MCF-7, MDA-MB-231 e MDA-MB-435), foram todas realizados em meio de cultura Ham's F-12 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) com DEMEM (Gibco) na proporção de 1:1, suplementado com 5% de soro de cavalo (Gibco), 20 ng/ml de fator de crescimento epidermal (EGF) (Sigma), 100 ng/ml de toxina colérica (Calbiochem Novabiochem Corporation, La Jolla, CA) 0,01 mg/ml de insulina bovina (Sigma), 500 ng/ml de hidrocortisona (Sigma), 100 µg/mL de ampicilina (Furp) e 100 µg/mL de estreptomicina (Furp). Este meio de cultura foi estabelecido como padrão em todos ensaios para que a influência sobre a expressão gênica das células fosse o mesmo para todas as células. Este meio de cultura é utilizado no cultivo de células epiteliais mamárias MCF-10A, as quais foram co-cultivadas com fibroblastos obtidos de câncer de mama em um trabalho em nosso grupo.

Para a realização dos ensaios de co-cultura, primeiramente, foram semeadas em placas de 6 poços com 9,6 cm² de área/poço (Becton Dickinson,

Labware, USA) $1,4 \times 10^5$ células epiteliais por poço, sendo colocado $8,4 \times 10^5$ células epiteliais por placa . Cada poço continha 3 mL de meio de cultura.

Passadas 24 horas, as células epiteliais, foram inseridas dentro de cada poço, os insertos com membranas (ou câmaras transmembrânicas) de $4,2 \text{ cm}^2$ de área e poros de $0,4 \text{ }\mu\text{m}$ (Becton Dickinson). Sobre a membrana destes insertos foram semeados os fibroblastos, numa proporção de aproximadamente 40% em relação ao número inicial de células epiteliais, ou seja, $0,6 \times 10^5$ células por poço ($3,6 \times 10^5$ células por placa) usando-se 2,5 mL do mesmo meio enriquecido que foram semeadas as células epiteliais em placas. As placas de co-culturas envoltas em papel alumínio foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera constante de 5% de CO_2 por um período de 72 horas. O aspecto celular pode ser visto na figura 2.

As células em co-cultura, separadas por membranas, foram recuperadas isoladamente após 72 horas em cultura, assim como as células em garrafas, pelo método de raspagem da superfície dos poços e da membrana dos insertos utilizando-se um Cell scraper (Corning Incorporated) e TRIzol[®] (Invitrogen). Inicialmente, acrescentou-se 200 μl do reagente a cada um dos insertos contendo os fibroblastos, assim como nos poços da placa contendo as células epiteliais e nas garrafas foi colocado 2mL do reagente. As células foram, então, raspadas e o volume das células em TRIzol[®] colocado separadamente em tubos de 1,5 ml devidamente identificados. As amostras foram estocadas a -70°C para posterior extração do RNA total de ambos os tipos celulares.

Figura 02 - Monocamada de fibroblastos de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama em co-cultura com células epiteliais mamárias MDA-MB231.

3.2.2– Extração de mRNA

Para extração de RNA total, as células foram colocadas em tubos contendo solução TRIzol[®] (Invitrogen); isto é, uma solução monofásica de fenol e isoticianato de guanidina. Para cada 1mL de TRIzol[®] adicionou-se 200mL de clorofórmio, misturando o conteúdo em vortex, e centrifugando à 12000 x g por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa transparente foi recuperada cuidadosamente e repassada para tubo novo, onde acrescentou-se 500μL de álcool isopropílico acrescido de glicogen (Invitrogen), deixando precipitar por 20 horas, a -20°C. Após este procedimento a solução foi centrifugada 12000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL etanol 75% (diluído em água tratada com dietilcarbonato) (DEPEC) (Merk KGaA, Frankfurter, Alemanha), centrifugado novamente a 12000 x g por 15 minutos.

A partir daí recupera-se o precipitado, dissolvendo em 10mL água tratada com dietildicarbonato (DEPEC) (Merk). A concentração de RNA foi determinada por comprimento de onda de 260 e 280nm em espectrofotometro Gene Quant pro (Amersham Biosciences, New Jersey, USA), esta leitura permitiu o cálculo da concentração do RNA. Para avaliar a qualidade do RNA extraído, todas as amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose de 1%. A verificação da integridade do RNA foi feita avaliando-se a relação entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 18 e 28S, como as amostras demonstradas na figura 3.

Figura 3 – Fotografia de gel de agarose demonstrando as bandas 18 e 28S de 6 amostras de fibroblasto de linfonodo (A,B,C,D,E e F)

3.2.3 – Reação de transcriptase reversa para obtenção de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 5µg de RNA diluído em água tratada com DEPEC para um total de 12µL. Adicionou 1µL de primer oligo dT¹²⁻¹⁸ (concentração inicial 0,5µg/µL) (Invitrogen) e 1µL de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's) a 10mM (Gibco). A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos para desnaturação das fitas de RNA e posteriormente deixado no gelo por 1 minuto. Então foram acrescentados 4µL de tampão da Super Script III (Invitrogen) e 1µL de dietiltreitol (DTT) a 100mM (Invitrogen), sendo a mistura incubou-se a 55°C por 10 minutos. Após acrescentar-se 1µL da enzima transcriptase reversa SSII-RT super script III (5UI/µL) (Invitrogen), incuba-se a reação a 55°C por 1 hora, para se obter a síntese da primeira fita de cDNA. Para inativação da enzima o tubo foi aquecido a uma temperatura de 70°C por 15 minutos. Após este procedimento, o cDNA foi estocado a -20°C, sua leitura foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 e 280nm (Gene Quant pro -Amersham Biosciences), esta leitura permitiu o cálculo da concentração do cDNA e posteriormente utilizado para qRT-PCR.

3.2.4 – Tecnologia do cDNA microarray

As lâminas de cDNA microarray 4.8K002 usada pelo grupo de nosso laboratório (tese de doutorado de Rosângela P. C. Santos) foram construídas no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, sob a coordenação do Dr. Luiz Fernando Lima Reis, e são constituídas de 4.800 sequências imobilizadas sendo que 4.608 correspondem a clones de ORESTES (“open reading frame expressed sequence tags”) que representam genes humanos e que respeitam critérios de inclusão:

- I) Os clones de genes tem sequências completas (full length);
- II) O clone tem tamanho maior que 300 pares de bases com sequência de alta qualidade (conteúdo de CG);
- III) São clones que quando pesquisados no site: <http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast> resultaram em genes com identidade > que 85% em 100 pb;
- IV) Sequência de cDNA mais próximo a região 3’.

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

As hibridizações das lâminas de cDNA microarray foram realizadas no Laboratório de Expressão Gênica do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, sob a coordenação da Dra Dirce Maria Carraro. Utilizou-se duplicata das amostras e RNA da célula HB4a como referência.

Para o cálculo do valor médio da expressão gênica, foram consideradas as réplicas de duas hibridizações de cada amostra, usando-se a inversão dos corantes Cy3 e Cy5 (Dye swap).

Para as hibridizações das lâminas de cDNA microarrays foram utilizadas três amostras de RNAm amplificado independentes, isto é, três amostras de fibroblastos de linfonodos comprometidos ou três amostras de fibroblastos de linfonodos não comprometidos provenientes de pacientes diferentes. Os fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos ou não comprometidos mantidos isoladamente em cultura foram os mesmos utilizados nas respectivas co-culturas MDA –MB231.

Análise matemática para seleção dos genes identificados como diferencialmente expressos por microarrays.

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

Foram realizados ensaios para determinar a expressão gênica de fibroblastos obtidos de linfonodos de seis pacientes com câncer de mama, sendo três provenientes de linfonodos comprometidos e três de linfonodos livres de doença. Estes fibroblastos foram mantidos isolados em cultura ou co-

cultivados com células de câncer de mama MDA-MB231, como descrito a seguir:

- 1- Fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos isoladamente (n=3)
- 2- Fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos isoladamente (n=3)
- 3- Fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivados com MDA-MB231 (n=3)
- 4- Fibroblastos de linfonodos comprometidos cocultivados com MDA-MB-231 (n=3)

O teste T pareado foi utilizado para determinar o nível de significância da diferença da expressão gênica entre os grupos e $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

Os genes diferencialmente expressos foram classificados segundo seu processo biológico utilizando-se o programa Onto Express (<http://vortex.cs.wayne.edu/ontoexpress>), que leva em consideração todas as sequências fixadas na lâmina com a mesma função (referência total). Funções diferencialmente moduladas foram aquelas com $p \leq 0,05$.

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

Os critérios de seleção de genes candidatos para avaliação de sua expressão por RT-PCR em tempo real foi variação de expressão ≥ 2 vezes entre as amostras.

3.2.5 – Confecção dos primers

Todos os oligonucleotídeos iniciadores de interesse foram desenhados a partir da sequência de RNAm do gene em questão contidos no site www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide. A escolha da região para confecção do oligonucleotídeo iniciador teve como primeiro critério incluir a região utilizada na lâmina de *microarray*, e como segundo critério ter grandes *introns* (regiões não codificadas, presentes no DNA genômico) entre os *exons* (regiões codificadas, presentes no DNA genômico e no transcrito de RNAm processado) de interesse contidos no DNA do gene. Deste modo objetivamos diminuir a chance de reação cruzada com o DNA genômico, pois a DNA polimerase, utilizada por nós, não sintetiza fragmentos grandes (Invitrogen). A localização dos introns e exons foi verificada no endereço Human Blat Search (genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgblat). O terceiro critério observado foi que o produto tivesse por volta de 200pb, pois deste modo a reação de qRT-PCR. tem maior eficiência.

A seguir, a sequência de oligonucleotídeos da região selecionada será fornecida ao programa *Primer 3* (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3 www.cgi), que elaborou as sequência dos oligonucleotídeos diretos e indiretos.

Para conferir similaridade dos primers desenhados utilizou o site www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. O ideal é que existam similaridades somente com o gene de interesse. Para verificar qual a melhor condição de amplificação do oligonucleotídeo e também se haverá formação de estruturas secundárias

utilizou-se o programa OLIGO TECH. Os primer elaborados estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 2 - Descrição dos primers referente aos genes selecionados para verificação de sua expressão por qRT-PCR, pb=pares de bases. (*)genes normalizadores.

Símbolo dos Genes	Tamanho do produto	Sequência do Oligonucleotídeo
ACTB*	188 pb	Direto 5'AGAAAATCTGGCACCAACC3' Reverso 5'AGAGGCGTACAGGGATAGCA3'
GAPDH*	400pb	Direto 5' CTGCCAACGTGTCAGTGGTG3' Reverso 5' CAGTGTGGTGGGGGACTGAG3'
GUS*	160pb	Direto 5' GGTTGGAGAGCTCATTTGGA3' Reverso 5' CCTGGTTTCATTGGCAATCT3'
TFRC*	150pb	Direto 5' TGATCGTGTGTCATGAGAGTGGA3' Reverso 5' GCACCGTTATTTTGTTCACGC3'
RPLPO*	149pb	Direto 5' GGCGACCTGGAAGTCCAACT3' Reverso 5' CCATCAGCACCCACAGCCTTC3'
PPIA*	170pb	Direto 5' CAAATGCTGGACCCAAACACA3' Reverso 5' TGCCATCCAACCACTCAGTC3'
MAP2K3	218pb	Direto 5'CTGCGGTTCCCTTACGAGT3' Reverso 5'GCAATGTCCGTCTTCTTGGT3'
AKAP8L	216pb	Direto 5'CCTCTTCATTCCCATGCAGT3' Reverso 5'CCTCTTCATTCCCATGCAGT3'
CREG1	112	Direto 5'GGTGGACCAAAAATCGTGAC3' Reverso 5'TGTGTATGAGCCACTTTAAGAACTT3'

3.2.6 – Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real

A qRT-PCR foi utilizada para quantificar a expressão dos genes alvo, ou seja quantifica o número de cópias do transcrito de RNA. É considerado um método muito preciso e reprodutível, onde a fluorescência introduzida na mistura da reação emite um sinal proporcional à concentração de cópias de transcrito. Ou seja, este método 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 (figura 4).

Figura 4 -Temos a representação do gráfico de amplificação quantitativo, onde observamos uma linha basal (não é possível identificar fluorescência pela pequena quantidade de amplificação), uma fase logarítmica (a quantidade de produto amplificado dobra a cada ciclo), uma fase linear (pequeno aumento de produto) e uma fase platô (não há mais amplificação do produto).

Nesta metodologia pode ser utilizado 2 estratégias para análise dos resultados, sendo: 1- quantificação absoluta e 2 – quantificação relativa. A quantificação absoluta de RNAm é determinada por uma curva padrão estabelecida a partir de quantidades precisamente conhecidas de material, então, esta curva é usada como referência na quantificação das amostras testadas. Na quantificação relativa utiliza-se a razão de expressão entre um gene alvo e um gene de referência (constitutivo), sendo esta a utilizada neste trabalho, pois segundo Pfaffl *et al.* (2001) é a quantificação mais adequada para experimentos que investigam mudanças fisiológicas em níveis de expressão gênica.

Utilizamos o sistema de detecção por *SYBR Green I* (Invitrogen) que se baseia no uso de uma molécula fluorescente, denominada *SYBR Green I*, que

quando intercalada à dupla fita da DNA, emite fluorescência e então é possível quantificar o total de moléculas de DNA produzidas. Durante os ciclos iniciais da reação de qRT-PCR, não há acúmulo de fitas duplas suficiente para que a fluorescência emitida possa ser detectada; então, no decorrer dos ciclos da reação há o aumento do produto amplificado e conseqüentemente o aumento do sinal de emissão de fluorescência até que ultrapassa o sinal de fluorescência de fundo, passando então a ser detectável (figura 5).

A metodologia que utiliza o *SYBR Green I* exige cuidadosa padronização, uma vez que este fluorocromo se intercala a qualquer molécula de dupla fita presente na reação (Figura 5). A especificidade da detecção de fluorescência com *SYBR Green I* pode ser comprometida pela formação de dímeros de oligonucleotídeos, pela concentração inadequada de oligonucleotídeos e pela formação de produtos inespecíficos de amplificação. Todos estes fatores levam à formação de moléculas de dupla fita não esperadas, as quais incorporam o *SYBR Green I* e têm sua fluorescência registrada.

Figura 5 – Metodologia do *SYBR Green I* onde o fluorocromo se intercala a qualquer molécula de dupla fita presente na reação.

Neste método de detecção, a confirmação de especificidade da amplificação é realizada por meio de análise da curva de desnaturação ou *melting curve*. Nesta curva, analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de fusão ou *melting temperature* (T_m) de cada fragmento, resultante da reação de amplificação. Cada fragmento amplificado possui um T_m específico, 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 qRT-PCR, quando a quantidade de produto formado aumenta de forma satisfatória quando comparados a concentração inicial de fitas molde que traduz a fluorescência da base (background). O ciclo exato no qual o limiar de fluorescência é definido denomina-se ciclo limiar (*Ct: threshold cycle*). Amostras mais concentradas (com maior número de fitas molde iniciais) atingem o limiar mais precocemente e exibem valores de Ct mais baixos.

Quando a eficiência da reação de qRT-PCR está próxima de 100%, o número de cópias geradas aumenta de forma exponencial, dobrando a cada ciclo da reação. O número de fitas-molde presentes no início da reação pode ser calculado a partir do Ct. Assim, a equação $N_f = N_o (1+E)^n$ descreve a amplificação exponencial de qRT-PCR, onde N_f é o número de fita-molde

em um determinado ciclo da reação, N_0 é o número de fita molde inicial, E é a eficiência de amplificação da reação e n é o número de ciclos.

A análise da expressão gênica por meio de qRT-PCR quantitativo usado em nosso estudo representa uma quantificação relativa dos genes de interesse, uma vez que requer um controle endógeno, ou seja, um gene cuja expressão não apresente variação estatisticamente significativa entre as amostras analisadas. Utilizaremos a princípio 6 genes endógenos (β ACTINA, GAPDH, GUS, RPLPO, PPIA e TFRC) cuja expressão serão avaliados pelo programa geNorm (Microsoft Excel) descrito mais adiante.

A quantificação relativa por qRT-PCR para uma determinada amostra é dada pela relação do C_t do gene de interesse (i) e o C_t do controle endógeno (e). Além da expressão de um gene de interesse em um grupo de amostras em relação a um grupo de referência, que neste trabalho poderá ser utilizada uma amostra de cDNA de células da linhagem HB4a, MDA-MB231 ou de um pool de fibroblastos comprometidos e não comprometidos.

Genes constitutivos selecionados

Os genes constitutivos, endógenos, de referência ou também chamados de calibradores normalmente são genes de manutenção celular; em muitos estudos as expressões desses genes são consideradas invariáveis entre diferentes tecidos, recentemente demonstrou-se que as expressões desses genes variam com o crescimento tumoral, hipóxia ou tratamentos

experimentais, podendo acarretar numa incorreta interpretação dos dados finais (Schmittgen e Zakrajsek, 2000; Janssens *et al.*, 2004).

Em RT-PCR quantitativo (qRT-PCR), análise de expressão do gene é dependente de uma normalização utilizando genes constitutivos como β actina e GAPDH. No entanto, muitos trabalhos mostraram que esses genes anteriormente muito utilizados podem sofrer uma variação na sua expressão que pode ser causado por fatores patológicos, tratamento com droga ou até mesmo fase do ciclo celular (Mogal *et al.*, 2006), sendo muitas vezes excluídos da análise final.

Para isso determinamos a expressão de vários candidatos a gene constitutivo para verificar qual tem menor variação no material utilizado, são eles β -actina, GAPDH, PPIA, GUSB, RPLPO e TFRC. Estes genes foram utilizados em um grande trabalho onde se analisou a expressão em tumores de mama de genes marcadores para resposta à recorrência à distância em pacientes tratadas com tamoxifen sendo linfonodo negativo e estrógeno positivo (Paik, S. *et al.*; 2004).

B-actina interage com fosfolipase D com microfilamentos de actina regulam a proliferação celular, o tráfico de vesículas e secreção (Kusner *et al.*, 2002). Em um trabalho onde se avaliou a expressão de 81 amostras de pacientes com câncer de mama, a β actina foi selecionado como o controle endógeno, pois se mostrou com menor variação que GAPDH (Benoy *et al.*, 2004). Este tem sido muito utilizado como referência ao se analisar a expressão gênica de pacientes com câncer de mama (Nakanishi *et al.*, 2003; Castelló *et al.*, 2002).

O gene GAPDH codifica uma enzima (gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase), que catalisa um passo do metabolismo dos carboidratos, fazendo a fosforilação oxidativa reversível da gliceraldeído 3 fosfato na presença de fosfato inorgânico e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). Estudos sugerem que GAPDH pode estar envolvido na regulação do ciclo celular modulando a atividade da ciclina-1 (Carujo *et al.*, 2006). GAPDH junto à β actina é um dos genes constitutivos mais explorados em estudos de comparação de expressão gênica, entretanto Barber, *et al.* (2005) neste estudo analisou a expressão desse gene em 72 tecidos humanos normais, constatando que este tem expressão gênica diferenciada.

PPIA é um gene que codifica um membro da família da peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase), enzimas que catalisa a cis-trans isomerização do peptídeo imídico da prolina em oligopeptídeos e acelera a dobradura das proteínas. A proteína ligante codificada pode atuar na imunossupressão, mediada por ciclosporina A (Liu *et al.*, 1990). A proteína também pode interagir com diversas proteínas do HIV e participa da atividade pró-inflamatória nas células endoteliais (Jin *et al.*, 2004). PPIA foi indicado entre os melhores genes constitutivos quando se trata de córtex motor (Johansson, S. *et al.*; 2007), é considerado um ótimo gene constitutivo para análise de comparação de expressão gênica (Feroze- Merzoug *et al.*, 2002), um outro estudo testou 16 tecidos de origens diferentes e mostrou que sua variação na expressão é baixa (Radonic. *et al.*; 2004).

O gene TFRC codifica uma glicoproteína de membrana que capta o complexo transferrina/ferro e internaliza o ferro e libera a transferrina para o plasma. Estes receptores estão fortemente presentes em percursoros

eritróides, em placenta e fígado. A superexpressão de TRFC1 é um achado comum em malignidades humanas (O'Donnell *et al.*, 2006) e a expressão de TRFC1 pode ser usado como um fator prognóstico para carcinoma escamoso de esôfago (Wada *et al.*, 2006). Abruzzo *et al.*, 2005 concluíram que a expressão de TFRC, GUSB e GAPDH é bastante constante em diferentes amostras, caracterizando-os como bons genes constitutivos.

GUSB codifica uma enzima que faz a hidrólise de vários proteoglicanos Beta-glucuronidase. Vários estudos indicam este como um bom gene constitutivo (Aerts *et al.*, 2004), especialmente em amostras de tireóide (Hucz *et al.*, 2006).

Fosfoproteína ribossomal grande, P0 (RPLP0) geralmente se apresenta em múltiplas cópias no ribossomo, são ácidas, e portanto, opostas a maioria das proteínas de ribossomais que são únicas e básicas. Ribossomos são organelas que catalisam a síntese de proteínas, são compostos de uma pequena subunidade 40S e uma grande 60S, quando juntas estas subunidades compõem 4 diferentes espécies de RNA e aproximadamente 80 diferentes proteínas estruturais. RPLP0 codifica uma proteína ribossomal que é um componente da subunidade 60S, é uma fosfoproteína neutra (P0) com uma região C-terminal quase idêntica à porção C-terminal das fosfoproteínas ácidas ribossomais P1 e P2. De Cremoux *et al.* (2004) realizaram um estudo com 79 amostras de tumor de mama no qual utilizam RPLP0 como gene de referência em qRT-PCR obtendo um bom resultado. Em tecido cerebral prefrontal humano demonstrou-se que RPLP0 se comportou com variação de expressão mais constante que outro 15 genes testados (Johansson *et al.*; 2007). Em estudos para o melhor candidato a gene constitutivo para células de sangue

bovino diferentes análises demonstram que RPLP0 foi o mais estável (Robinson *et al.*, 2007).

Condições da reação de qRT-PCR

Para determinar a melhor temperatura a ser utilizada em qRT-PCR para o estudo da expressão dos genes acima citados, utilizamos em RT-PCR convencional células de várias origens, isto é, linhagens epiteliais mamárias não tumorais (MCF-10 e HB4a) e malignas (MCF-7, MDA-MB-231) e pool de RNAm de fibroblastos, obtidos de cultura primária de tecido de linfonodo comprometido por célula epitelial (FT) ou não comprometido (FN). Foi padronizado para todos os primers, como sendo uma ciclagem ideal: primeiramente uma temperatura inicial de 95°C por 15 minutos, seguidos de 40 ciclos de 3 temperaturas, sendo a primeira 95°C por 15 segundos para desnaturação das fitas, depois 60°C por 1 minuto para o anelamento do primer e por último 72°C por 1 minuto para extensão.

Para cada reação de qRT-PCR foi utilizado a princípio 2 µL (200 ng) de cDNA – derivado da análise de eficiência descrita abaixo, 0.8 µL de MgCl₂ (50 mM), 1.6 µL de dNTP (2.5 mM), 0.4 µL de cada oligonucleotídeo (direto e reverso) (10 µM), 1 µL de DMSO 10X, 0.3 µL de DNA polimerase Taq Platinum (5 U/µL) (Invitrogen), 0.2 µL de *Sybr Green I* (1/100) e completado com água para o total de 15 µL. Utilizaremos o termociclador Gene Amp (Perkin Elmer, EUA) e o sistema operacional Rotor Gene™ 6 System (Corbett Research,

Mortlake, Sydney, Austrália). As condições para as reações de qRT-PCR foi padronizada utilizando-se cDNA das linhagens celulares de fibroblastos.

As reações foram realizadas em triplicatas e os valores do Ct dos ensaios foram considerados satisfatórios se não apresentassem diferença maior que 1,5.

Determinação do ciclo limite

A curva de quantificação da expressão gênica, que se dá a partir do Ct (ciclo limite ou *threshold cycle*), parâmetro definido como o número de ciclo em que a fluorescência gerada pelo *SYbr Green I* atinge um limite acima da fluorescência de fundo. Em nosso estudo o ciclo limite ficou em torno de 0,02 não variando mais que 0,005.

Especificidade do amplicon

A curva de desnaturação ou *melting curve* permite a confirmação da especificidade da amplificação, onde são relacionadas à fluorescência e a temperatura; esta curva consiste da monitorização da fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura de fusão ou *melting temperature* (T_m) de cada fragmento, resultante da reação de amplificação. Abaixo listamos a temperatura de fusão ou *melting temperature* (T_m) de cada fragmento utilizado (tabela 3 e figura 7)

Tabela 3 – Temperatura de fusão de cada primer

Genes	Temperatura de fusão
β ACTINA	87,5°C
GAPDH	87,8°C
GUS	83°C
TFRC	80°C
RPLPO	84°C
PPIA	80,5°C
MAP2K3	89,5°C
AKAP8L	87,5°C
CREG1	81,5°C

Figura 6 - Gráfico que mostra Curva de desnaturação apresentando um único pico de T_m , resultante de um único produto, mostrando assim a especificidade da reação.

Eficiência da Reação

Determinamos a eficiência de cada sonda por qRT-PCR, como sugerido por Pfaffl *et al.* (2001). Para tanto, um pool de RNAm originado de fibroblastos comprometido e não comprometido (o mesmo utilizado como normalizador posteriormente) foi diluído para obter concentrações de 500ng, 250ng, 125ng, 62,5ng e 31,25ng. O ensaio foi feito em triplicata e a eficiência foi de 0.9 a 1.1 para todos genes analisados.

Figura 7 – Demonstração da curva de eficiência do realizado pelo sistema operacional Rotor Gene™ (Austrália).

Obtivemos um intervalo de eficiência de 0,95 a 1,13 entre todas as reações (tabela 4)

Tabela 4 – Eficiência e slope da reação de cada primers utilizados em reação de qRT-PCR e cálculo da eficiência da reação pelo slope.

Gene	slope	Eficiência	Cálculo da eficiência pelo Slope
β ACTINA	-3,04	1,13	2,12
GAPDH	-3,41	0,95	1,96
GUS	-3,25	0,98	2,03
TFRC	-2,88	1,07	2,22
RPLPO	-3,52	0,92	1,92
PPIA	-3,10	1,19	2,09
MRFRAP1	-3,14	1,08	2,07
MERTK	-3,34	0,99	1,99
TTYH3	-3,06	1,12	2,11
OSBPL3	-3,37	0,98	1,98
C12 orf 32	-3,23	1,04	2,04
IGFBP4	-3,37	0,98	1,97

Normalização dos dados de qRT-PCR

Determinamos inicialmente quais os genes seria utilizada para fator de normalização. A expressão de seis genes foi avaliada pelo programa geNorm (Microsoft Excel), para determinar quais os mais estáveis nestas amostras como descrito por Vandesompele *et al.* (2002) e largamente utilizado para escolha dos genes constitutivos para normalização da

reação de qRT-PCR para diferentes amostras (Nicot *et al.*, 2005; Kim *et al.* 2003; Szabo *et al.*, 2004; Larionov *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2007)

O programa de geNorm determina os genes constitutivos mais estáveis de uma amostra de um conjunto de genes candidatos, calculando a partir da eficiência de cada sonda elevado ao delta Ct da referência menos o delta Ct da amostra de cada candidato (Goossens *et al.*, 2005; Erkens *et al.*, 2006), como demonstrado na formula abaixo:

$$E_{\text{constitutivo}}^{(\Delta\text{ct ref})-(\Delta\text{ct amostra})}$$

A estabilidade dos genes constitutivos é determinada partindo-se do princípio de que dois genes ideais possuem razão de expressão idêntica em qualquer amostra a ser analisada. O programa geNorm avalia a razão de expressão de cada gene constitutivo em relação aos demais sempre aos pares permitindo o cálculo do desvio padrão desses valores transformado em escala logarítima, então a média do desvio padrão de cada gene em relação aos demais é calculado fornecendo uma medida de estabilidade de expressão do gene (M). O gene com a expressão mais estável tem o valor de M mais baixo, permitindo então a exclusão dos genes menos estáveis (Vandesompele *et al.*, 2002).

A cada gene normalizador excluído, o programa atribui automaticamente um novo valor referente à estabilidade dos demais sobre as amostras. Esse processo se repete até que permaneçam apenas os genes cuja expressão seja mais estável, determinado a

combinação adequada a ser utilizado na análise de qRT-PCR. Preconiza-se que nesta análise se utilize no mínimo três genes constitutivos estáveis para se obter o Fator de Normalização confiável. Um valor menor que 1,5 foi estabelecido como medida de estabilidade de expressão, se esse valor for maior é necessário a inclusão de um novo gene constitutivo (Vandesompele *et al.*, 2002).

A partir disso resulta o fator de normalização de expressão do gene para cada amostra analisadas em qRT-PCR, baseado na média geométrica de um número definido como operador de genes constitutivos, nos resultando um valor chamado de Fator de Normalização (FT) (Vandesompele *et al.*, 2002).

Como primeiro passo dessa normalização utilizamos 10 amostras de fibroblastos isolados e 10 amostras de fibroblastos co-cultivado com MDA-MB231. Nosso objetivo inicial foi estipular qual seria a amostra (referência) normalizadora ideal e, principalmente, determinar os melhores candidatos a genes constitutivos. Com base em dados da literatura, nossos candidatos foram β actina, GAPDH, PPIA, GUS, RPLPO e TFRC. A estabilidade dos genes constitutivos determinada por M foi estabelecida, e os genes com a expressão mais estável com o valor de M menor permitiu então a exclusão dos genes menos estáveis.

Em todas as análises com diferentes amostras referência TFRC, GAPDH e β actina foram excluídos pelo programa GeNorm por terem sua expressão menos estável que os genes GUS, RPLP0 e PPIA. O grau de estabilidade dos 6 genes com amostra referência escolhida como ideal

(pool de fibroblasto), RPLP0 foi o gene mais estável, seguido de PPIA e por último GUS (tabela 7, 8 e 9).

Figura 8 – Grau de estabilidade calculado pelo programa GeNorm para todos genes normalizadores candidato.

As tabelas abaixo mostram os resultados dos 6 genes primeiramente utilizando como referência a célula epitelial HB4a, posteriormente MDA-MB231 e por ultimo um pool de fibroblasto comprometidos e não comprometidos.

Utilizando HB4a como normalizador os genes eliminados pelo programa foram TFRC com $M = 2,086$; GAPDH com $M=1,584$ e β actina com $M=1,882$ (tabela 5).

	GUS	RPLPO	TFRC	PPIA	GADPH	BACTINA	FATOR DE NORMALIZAÇÃO
HB4a	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	6.0608
1	8.16E-02	1.74E-01	3.18E+00	8.63E-02	1.75E-01	2.09E-01	0.6486
2	2.73E-02	1.49E-01	1.90E-01	7.77E-02	9.30E-02	2.37E-01	0.4128
3	5.08E-02	3.11E-01	1.37E+00	8.85E-02	3.44E-01	1.30E+00	0.6775
4	2.31E-02	8.55E-02	2.08E-01	4.36E-02	1.08E-01	9.41E-01	0.2675
5	1.67E-01	1.50E+00	2.71E+01	1.06E+00	6.18E-01	2.96E+00	3.8954
6	2.60E-01	1.22E+00	1.24E+01	7.43E-01	1.35E+00	4.83E+00	3.7469
7	1.98E-01	1.13E+00	1.96E+01	3.97E-01	3.62E-01	3.75E-01	2.7061
8	9.26E-02	7.70E-01	1.67E+01	5.78E-01	3.14E-01	1.02E+00	2.0943
9	5.08E-01	2.05E+00	6.87E+01	4.71E-01	9.26E-01	3.32E+00	4.7843
10	1.61E-01	1.96E+00	2.58E+01	5.63E-01	1.09E+00	3.49E+00	3.4048
11	2.69E-03	1.17E-02	1.48E-02	7.41E-03	1.67E-03	1.41E-01	0.0374
12	3.02E-01	1.11E+00	1.60E+01	4.52E-01	6.73E-01	1.32E+00	3.2298
13	1.17E-02	7.42E-02	1.82E-01	5.16E-02	6.59E-02	1.91E-01	0.2156
14	1.58E-01	1.17E+00	5.53E+00	6.70E-01	5.25E-01	1.23E+00	3.0178
15	2.93E-02	1.78E-01	9.93E-02	5.98E-02	5.09E-01	1.58E-01	0.4113
16	2.99E-02	1.56E-01	8.28E-01	1.38E-01	2.38E-01	4.80E-01	0.5236
17	7.11E-02	3.93E-01	1.17E+00	1.52E-01	6.98E-01	7.33E-01	0.9810
18	1.34E-01	2.63E+00	2.58E+01	1.95E+00	2.09E+00	5.09E+00	5.3407
19	8.87E-03	3.85E-02	2.05E-01	2.64E-02	7.23E-03	8.84E-01	0.1261
20	1.61E-02	6.73E-02	1.41E-01	4.76E-02	3.07E-02	1.19E+00	0.2257
M < 1.5	1.387	1.143	2.086	1.240	1.584	1.882	

Tabela 5 - Valores de M e Fator de normalização gerada pelo programa Genorm com seis genes constitutivos em 20 amostras de co-cultura e isolados (de fibroblastos de linfonodo axilar de pacientes com câncer de mama comprometidos e não comprometidos), tendo com amostras referência HB4a

Utilizando MDA-MB231 como amostra normalizadora os genes eliminados pelo programa foram TFRC com $M = 2,290$; GAPDH com $M=1,6$ e β actina com $M=1,864$. Todos os valores de M dos genes eliminado se mostraram um pouco mais baixo nesta análise mostrando que HB4a foi melhor amostra normalizadora que MDA-MB231 (Tabela 6).

	QUS	RFLPO	TFRC	PIA	GAPDH	BACTINA	FATOR DE NORMALIZAÇÃO
mda	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	5.1819
1	1.88E-01	3.86E-02	1.33E+01	1.73E-01	2.01E-01	4.16E-02	0.6337
2	0.01E-02	0.02E-02	7.94E-01	1.05E-01	1.05E-01	4.73E-02	0.4191
3	1.23E-01	1.05E-01	5.72E+00	1.78E-01	3.94E-01	2.59E-01	0.6928
4	5.99E-02	2.89E-02	0.71E-01	0.70E-02	1.24E-01	1.69E-01	0.2696
5	0.05E-01	5.06E-01	1.13E+02	2.12E+00	7.66E-01	5.01E-01	3.3261
6	0.30E-01	4.12E-01	5.17E+01	1.40E+00	1.04E+00	0.03E-01	3.7784
7	4.80E-01	3.81E-01	8.21E+01	7.68E-01	4.16E-01	7.48E-02	2.7274
8	2.24E-01	2.59E-01	7.00E+01	1.10E+00	3.00E-01	2.00E-01	2.1102
9	1.23E+00	0.91E-01	2.87E+02	9.47E-01	1.00E+00	0.01E-01	4.8219
10	3.89E-01	0.60E-01	1.00E+02	1.13E+00	1.25E+00	0.99E-01	3.6316
11	0.03E-03	3.99E-03	0.20E-02	1.40E-02	1.01E-03	2.82E-02	0.0377
12	7.31E-01	3.73E-01	6.71E+01	0.09E-01	7.71E-01	2.63E-01	3.2952
13	2.69E-02	2.50E-02	7.83E-01	1.04E-01	7.86E-02	3.60E-02	0.2173
14	3.82E-01	3.93E-01	2.31E+01	1.35E+00	0.01E-01	2.45E-01	3.0416
15	7.10E-02	0.00E-02	4.16E-01	1.30E-01	5.89E-01	3.16E-02	0.4145
16	7.25E-02	5.24E-02	3.40E+00	2.70E-01	2.72E-01	9.57E-02	0.6277
17	1.72E-01	1.32E-01	4.66E+00	3.05E-01	0.09E-01	1.46E-01	0.3687
18	3.24E-01	0.83E-01	1.08E+02	3.01E+00	2.40E+00	1.02E+00	6.3827
19	2.10E-02	1.28E-02	0.07E-01	0.31E-02	8.28E-03	1.76E-01	0.1271
20	3.91E-02	2.26E-02	5.88E-01	9.57E-02	3.52E-02	2.37E-01	0.2275
M<1.5	1.309	1.197	2.290	1.295	1.902	1.864	

Tabela 6 - Valores de M e Fator de normalização gerada pelo programa Genorm com seis genes constitutivos em 20 amostras de co-cultura e isolados (de fibroblastos de linfonodo axilar de pacientes com câncer de mama comprometidos e não comprometidos), tendo com amostras referência MDA-MB231

Utilizando o Pool de fibroblasto como amostra normalizadora os genes eliminados pelo programa foram TFRC com $M = 1,9$; GAPDH com $M=1,5$ e β actina com $M=1,862$. Todos os valores de M foram um pouco mais baixo em todos genes analisados mostrando que o pool de fibroblastos foi melhor amostra normalizadora que as anteriores (tabela7).

	GUS	RPLPO	TFRC	PPIA	GADPH	BACTINA	FATOR DE NORMALIZAÇÃO
pool	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	12.9752
1	2.04E-01	3.52E-02	8.04E-02	1.55E-02	1.29E-01	6.52E-02	0.6243
2	6.83E-02	3.02E-02	4.81E-03	1.39E-02	6.82E-02	7.42E-02	0.3974
3	1.27E-01	6.29E-02	3.46E-02	1.59E-02	2.52E-01	4.07E-01	0.6522
4	5.78E-02	1.73E-02	5.27E-03	7.82E-03	7.94E-02	2.95E-01	0.2575
5	4.19E-01	3.04E-01	6.86E-01	1.89E-01	4.53E-01	9.27E-01	3.7500
6	6.51E-01	2.48E-01	3.13E-01	1.33E-01	9.89E-01	1.51E+00	3.6070
7	4.96E-01	2.29E-01	4.97E-01	7.13E-02	2.66E-01	1.17E-01	2.6050
8	2.32E-01	1.56E-01	4.24E-01	1.04E-01	2.31E-01	3.19E-01	2.0161
9	1.27E+00	4.15E-01	1.74E+00	8.46E-02	6.79E-01	1.04E+00	4.6057
10	4.02E-01	3.97E-01	6.52E-01	1.01E-01	8.03E-01	1.09E+00	3.2777
11	6.75E-03	2.38E-03	3.75E-04	1.33E-03	1.22E-03	4.43E-02	0.0360
12	7.55E-01	2.25E-01	4.06E-01	8.12E-02	4.94E-01	4.13E-01	3.1092
13	2.94E-02	1.50E-02	4.62E-03	9.27E-03	4.84E-02	5.97E-02	0.2076
14	3.95E-01	2.37E-01	1.40E-01	1.20E-01	3.85E-01	3.85E-01	2.9052
15	7.33E-02	3.61E-02	2.51E-03	1.07E-02	3.73E-01	4.96E-02	0.3959
16	7.49E-02	3.15E-02	2.10E-02	2.48E-02	1.74E-01	1.50E-01	0.5040
17	1.78E-01	7.94E-02	2.95E-02	2.73E-02	5.12E-01	2.29E-01	0.9444
18	3.35E-01	5.31E-01	6.52E-01	3.49E-01	1.54E+00	1.59E+00	5.1413
19	2.22E-02	7.79E-03	5.19E-03	4.74E-03	5.31E-03	2.77E-01	0.1214
20	4.04E-02	1.36E-02	3.56E-03	8.55E-03	2.25E-02	3.71E-01	0.2173
M < 1.5	1.260	1.109	1.975	1.260	1.575	1.862	

Tabela 7 - Valores de M e Fator de normalização gerada pelo programa Genorm com seis genes constitutivos em 20 amostras de co-cultura e isolados (de fibroblastos de linfonodo axilar de pacientes com câncer de mama comprometidos e não comprometidos), tendo com amostras referência pool de fibroblastos.

Avaliação da expressão dos genes alvo

A expressão diferencial dos transcritos de interesse (genes alvo) foi determinado pelo método de quantificação relativa em relação ao Fator Normalizador derivado dos genes constitutivos já citado anteriormente. A quantificação gênica dos fibroblastos oriundos de co-cultura e isolados foi realizada e na escolha das células o pool celular de fibroblastos do que HB4a, MDA-MB-231 foi selecionado como amostra referência candidata em todos os ensaios.

Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizado o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001), e vastamente utilizado (Radonic et al, 2004), sendo:

$$R = E_{\text{alvo}}^{(\Delta \text{ct ref}) - (\Delta \text{ct amostra})} / E_{\text{constitutivo}}^{(\Delta \text{ct ref}) - (\Delta \text{ct amostra})}$$

onde: o **E** corresponde a eficiência da amplificação dos iniciadores específicos para o transcrito alvo. As eficiências de amplificação dos iniciadores específicos para os transcritos alvos e o tecido de referência foram calculados de acordo com a equação: **E = 10^{-1/slope}**. Onde: Slope corresponde a inclinação da reta obtida da análise da variação dos Cts dos genes alvos ou constitutivos em função do *log* das diferenças de concentração de cDNA. Foram utilizadas 5 diferentes concentrações de cDNA de um pool de fibroblastos oriundo de linfonodo processado por uma diluição seriada de cDNA. O **Δct amostra** corresponde a média dos CTs do gene alvo na amostra alvo e **Δct ref** corresponde a média do gene alvo no tecido de referência .

Neste trabalho o calculo da expressão diferencial foi realizado substituindo o denominador [**E_{constitutivo}**^{(Δct ref)-(Δct amostra)}] pelo Fator de Normalização, como sugerido por Vandesompele *et al.* (2002), ficando então:

$$R = E_{\text{alvo}}^{(\Delta \text{ct ref}) - (\Delta \text{ct amostra})} / \text{FN}$$

Onde: **FN** corresponde ao Fator de Normalização que é calculado a partir do delta ct de cada candidato, baseado na média geométrica de um número definido como operador de genes constitutivos, derivado do programa geNorm que determina os genes constitutivos mais estáveis de um conjunto de genes testados.

Análise estatística final

Utilizamos o *teste t* pareado para análise de expressão gênica por cDNA microarray e “Análise de Variâncias com Dois Fatores para Medidas Repetidas” para múltiplas comparações, correções de Huynh-Feldt e Bonferroni para análise de expressão gênica por qRT-PC, sendo $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADO

Foi analisado primeiramente o perfil de expressão gênica de fibroblastos co-cultivados com células MDA-MB231 em relação a fibroblastos cultivados isoladamente por cDNA microarray. Dentre genes diferencialmente expressos alguns foram selecionados para ter sua expressão avaliada em fibroblastos isolados e co-cultivados com três linhagens celular de câncer de mama, em análise por RT-PCR em tempo real.

4.1 – Expressão gênica determinada por ensaio de cDNA microarray

Inicialmente determinamos a influência de célula de câncer da mama no perfil de expressão gênica de fibroblastos de linfonodos comprometidos [FN(+)] de três pacientes com câncer de mama e três amostras de fibroblastos de linfonodo não comprometido [FN(-)] de outras três pacientes com câncer de mama. Para isto analisamos a expressão gênica de amostras de fibroblastos co-cultivado com MDA-MB231 em relação a fibroblastos isolados.

4.1.1 - Perfil da expressão gênica de fibroblasto de linfonodo não comprometido co-cultivado com MDA-MB231 em relação a fibroblastos de linfonodo não comprometido isolado [FN(-)/MDA vs FN(-)].

Quatrocentos e quinze (415) genes foram modulados em fibroblastos de linfonodo não comprometido co-cultivado com a célula MDA-MB231 comparado à fibroblasto de linfonodo não comprometido [FN(-)/MDA vs FN(-)], sendo 226 (duzentos e vinte e seis) hipoexpressos e 189 (cento e oitenta e nove)

hiperexpressos nas condições de co-cultura. Dentre esses genes a variação de expressão gênica foi de 1,01 à 9,04 vezes em genes hiperexpressos e 1,01 à 6,71 vezes em genes hipoexpressos. A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado, utilizando a expressão diferencial destes quatrocentos e quinze (415) genes, foi capaz de classificar corretamente os fibroblastos provenientes de linfonodos não comprometidos co-cultivados com células epiteliais mamárias malignas MDA-MB231, em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos isolados em cultura (Figura 9).

Dentre os genes diferencialmente expressos cento e vinte e nove (129) tiveram essa expressão variando mais que 2 vezes, sendo 36 genes hiperexpressos e 93 genes hipoexpressos em fibroblasto de linfonodo não comprometido co-cultivado com MDA-MB231 [FN(-)/MDA] (Tabela 8). Considerando este padrão de expressssão gênica observamos que seis funções biológicas foram moduladas (Tabela 9).

Figura 9a - Análise de Agrupamento Hierárquico não supervisionado de 3 amostras de fibroblastos derivados de linfonodos não comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB-231), e de 3 amostras de fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos em cultura isoladamente. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde). Regiões A e B ampliadas.

Figura 9b - Análise de Agrupamento Hierárquico não supervisionado de 3 amostras de fibroblastos derivados de linfonodos não comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB-231), e de 3 amostras de fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos em cultura isoladamente. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde). Regiões C e D ampliadas.

Tabela 8 - Genes hiperexpressos ou hipoexpressos em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivado com MDA-MB231 em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos.

Genes Hiperexpressos em FN(-)/MDA vs FN(-)	Genes Hipoexpressos em FN(-)/MDA vs FN(-)
PM2-ST0303-002-E07, TMEM154, SEC63, USP7, FAM134C, ALDH1A3, C19orf6, PBP1, RC4-LT0071-015-A09, TRIO, POLQ, KIAA0310, JAK2, FAM59A, RANBP2, SRGAP1, NFKBIZ, KTELC1, DLC1, CM1-FT0052-267-C04, AKAP12, ROCK2, RIPK4, IL4R, POLR2A, SMAD3, PSMD3, CBLB, GPR56, CDC2L5, THAP3, SLC12A4 FRMD4A, CLASP2, DENND1A, SH3GLB1	MR3-HT1104-002-G11, TACC1, ETNK2, CM1-UM0031-139-H08, UBE1C, CIB1, C1QB, QV1-DT0070-339-E08, ADH5, ACTR10, RIT1, RBED1, SEC11A, GSTA4, KIF21B, MTFMT, PM0-HT0339-015-B12, HMGCL, CCDC90B, PSMB9, THUMPD3, COQ9, CHMP4A, NPR2, DUSP18, TRA16, PMPCB, ATP5H, ASAH1, MR3-HN0123-001-C12, ZCCHC17, SNX5, CM0-AN0007-490-C02, WDR42A, HECTD3, ADORA2B, MAD2L2, SKP1A, SEC31A, TIPIN, RC0-TN0080-031-E01, CM0-PT0049-140-D01, WNT10B, RC0-FN0025-021-E06, FLOT1, AKAP8L, BLVRA, RC4-BN0408-012-F06, DARS, TSPAN8, RPL18, GTF2A2, CHPT1, ATP5L, QV0-BN0040-160-B12, PGCP, RGS2, BLOC1S1, HAX1, NENF, UBE2L6, PHYH, PRR8, SAT2, XRCC6BP1, NUDT5, TMSB4Y, RC6-ST0198-011-G01, MRPL39, CREG1, CM0-BT0304-093-B08, MGST3, LSM3, UXT, COX5B, EIF3S3, MRPS21, PSMA5, JOSD3, TSC22D3, NOLA3, CHD8, C6orf170, FLJ11151, ATP5J2, TPM2, C17orf37, PCTK3, GPM6B, HDPY-30, MRPL22, HRAS, B2M

Tabela 9 - Funções biológicas reguladas em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivado com MDA-MB231 em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos [FN(-)/MDA vs FN(-)] onde ao menos dois genes envolvidos estavam representados na lâmina de cDNA microarray (Referência $\geq$ 2) ($p\leq 0,05$, Onto-Express).

Processos Biológicos	Genes hiperexpressos	Genes hiporepressos	Referência
Polimerização do filamento de actina	WASF3	RAC1	4
Morfogênese da ramificação do tubo	TIMELESS, DICER		4
Transmissão de sinal ligado a transmissão de sinal	IL18RAP, CD59, CBLB	PLAUR, IFNAR1, NPR2, HRAS, TTRAP, MAG11	38
Tradução	RPL3, RPL32P3, KIAA0664	MRPL22, C15orf15, MTFMT, GART, EIF3S3, RPL18, MRPS21	49
Via de sinalização do receptor da célula T	BCAR1	UBE2N	4
Ativação da célula T	SMAD3, CBLB	NCK1	7

4.1.2 - Perfil da expressão gênica de fibroblasto de linfonodo comprometido co-cultivado com MDA-MB231 em relação a fibroblastos de linfonodo comprometido isolado [FN(+)/MDA vs FN(+)]

Setecentos e setenta e nove (779) genes foram modulados em fibroblastos de linfonodo comprometido co-cultivado com célula MDA-MB231 comparado a fibroblasto de linfonodo comprometido [FN(+)/MDA vs FN(+)], sendo que 396 (trezentos e noventa seis) genes foram hiporepressos e 383 (trezentos e oitenta e três) genes hiperexpressos em fibroblastos nas condições de co-cultura. A análise de agrupamento hierárquico não

supervisionado, utilizando a expressão diferencial desses setecentos e setenta e nove (779) genes, foram capaz de classificar corretamente os fibroblastos provenientes de linfonodos comprometidos co-cultivados com células epiteliais mamárias malignas MDA-MB231, em relação a fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos isolados em cultura (Figura 10). Dentre esses genes a variação de expressão gênica foi de 1,05 à 6,67 vezes em genes hiperexpressos e 1,03 à 7,16 vezes em genes hipoexpressos. Na tabela 10 representamos duzentos e cinco (205) genes com expressão variando mais que 2 vezes, sendo noventa e cinco (95) genes hiperexpressos e 110 genes hipoexpressos em FN(+)/MDA. Algumas funções biológicas foram reguladas em fibroblastos comprometidos pela célula epitelial MDA-MB231 (Tabela 11).

Figura 10a - Análise de Agrupamento Hierárquico não supervisionado de 3 amostras de fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB-231 e de 3 amostras de fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos em cultura isoladamente. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde). Regiões A, B e C ampliadas.

Tabela 10 - Genes hiperexpressos ou hipoexpressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos co-cultivado com MDA-MB231 em relação a fibroblastos de linfonodos comprometidos.

Genes Hiperexpressos em FN(+)/MDA vs FN(+)	Genes Hipoexpressos em FN(+)/MDA vs FN(+)
COTL1, LIMK1, SLC39A7, SLC12A4, TOM1, MGC2752, MVP, MR0-AN0082-002-E10, FADS2, ACLY, MAP2K3 , FBXW5, ITGB1, MBD3, GBF1, AXUD1, SF1, DIAPH1, IL1B, PM0-CT0263-005-E08, ACTN4, FAM134C, COPE, RC0-FN0025-031-B01, BLCAP, ATF7, TSPAN17, SPNS1, SERINC2, SHC1, INADL, QV3-HT1017-481-E02, MAP1LC3B, RNF40, INPPL1, ADIPOR2, CPZ, SAE1, SPINK7, MR2-GN0126-008-G08, CXXC1, CLIP2, JPH4, QV0-BT0263-132-H07, DNAH1, CBR3, PM2-ST0303-002-E07, MGC16824, M-RIP, MR1-HT1184-001-C10, KIAA0310, AMD1, PM0-ET0274-001-A03, RAD23A, C16orf5, PM3-FN0213-001-A04, LTBP3, VPS24, PM0-GN0210-003-G10, C22orf5, FNDC4, C6orf85, SLC4A2, NMT1, GAS2L1, MAP3K12, FAIM2, PLXNB2, AKT1S1, TTLL12, MLLT1, RC0-HT0934-031-E09, LMO7, OPTN, GCS1, RC2-MT0148-110-H06, GCAT, FOXN3, PTP4A1, CM0-TN0034-493-G10, PIK3R3, CM1-NT0271-633-D08, KIDINS220, NEK9, MR3-SN0066-004-G07, WDR13, AREG, MR4-NT0141-213-A11, POLR2A, ASNSD1, RC0-ST0280-031-D02, PLCG2, TMEM131, SNRP70, TMEM8.	PRKAG2, SEL1L, FLJ20160, PTPRC, QV3-OT0063-165-A05, HECTD3, TMEM9B, ERRFI1, ZHX2, RGS2, NUDT5, GLT8D1, CHAF1A, LGTN, COQ9, SEC31A, COPS6, TMEM49, IFNGR1, PFKP, ZNF335, CDC27, MR3-HT1104-002-G11, EXOC3L2, AQP3, CM1-BN0020-176-E11, HSP90B1, ATP5L, QV3-DT0044-045-A10, SFRS7, TTYH3, SLC9A7, NGFRAP1, LOXL2, ADORA2B, DNAJA3, HN1, MGST2, ATG12, LOC644246, ASAH1, PM0-HT0911-010-D01, EVPL, RALA, MR3-HN0123-001-C12, JMJD6, URM1, PRR8, YG11B, NCKAP1L, ACTR10, C1QB, MED4, MR1-CT0529-002-E09, ETNK2, CCDC90B, RC6-ST0198-011-G01, C1orf50, HMCN1, GZMB, FUBP1, CCDC91, MGST3, CYB5D2, XRCC6BP1, STMN2, GLCE, COX5B, DAPK1, PTGS1, PM0-LT0019-005-F04, PSMC6, CM1-DT0049-136-C09, ATP5H, ARL6IP5, PLOD2, KIAA1429, QV0-BN0040-160-B12, HYPK, C4orf20, SNX5, NENF, SKP1A, CHD8, GTF2A2, C6orf170, UBE2V2, MOXD1, NUDT5, MRPL22, ZNF189, LXN, HDPY-30, RC1-IT0013-022-C08, TMSB4Y, JOSD3, ATP5J2, LSM3, PHYH, MRPS21, PMP22, RC3-CI0043-024-D07, SDCCAG10, NOLA3, B2M, PPP1R12A, CM0-TN0034-494-D11, TMED2, QV1-DT0070-339-E08, CM3-CI0002-352-H03.

Tabela11 -: Funções biológicas reguladas em fibroblastos de linfonodos comprometidos co-cultivado com MDA-MB231 em relação a fibroblastos de linfonodos comprometidos [FN(+)/MDA vs FN(+)] onde ao menos dois genes envolvidos estavam representados na lâmina de cDNA microarray (Referência $\geq$ 2) ($p\leq 0,05$, Onto-Express).

Processo Biológico	Genes hipoexpressos	Genes hiperexpressos	Referência
Fosforilação da peptidil-serina	STK4	HIPK3, MAP3K12	4
Autofosforilação da proteína amino ácida	CAMKK2, TAOK3, IGF1R, MAP3K12	VRK2, STK4	10
Ciclo celular	RIF1, CDCA8, PRC1, NEK9, FOXN3, RASSF4, CDKN2C, CDK6, MAPK13, TFDP1, STRN3, NCAPD2, ATM, APC, POLS, BIN1, CNTROB, NF2, S100A6, PTP4A1, NBN	RCBTB1, RGS2, FAM33A, MAD2L2, BCL10, MAEA, CDKN1B, CDK7, CHAF1A, CDC14A, CUL3, CUL4A, ANLN, BUB1B, STARD13,	156
Regulação da endocitose	BIN1	ZFYVE16	3
Regulação negativa da motilidade celular	ACTN4	CDKN1B	2
Processo metabólico do ácido carboxílico	GAD1	ASAH1	3
Via de sinalização de receptor de dopamina	GNAO1	HMP19	
Processo biossintético de uma ramificação da família de aminoácido		BCAT2, BCAT1	2
Regulação positiva da atividade da proteína quinase	MAP2K3	PTPRC	3
Fusão mitocondrial	MFN2, OPA1		3
Organização e biogênese de membrana mitocondrial	MFN2	TIMM50	2
Transporte de tetraciclina	SPNS1, HIATL1		3
Myristoylation and lipoylation da proteína N-terminal	NMT1, MNT2		2
Processo metabólico de oligossacarídeo	ST6GAL1, GCS1		2
Processo biossintético da prostaglandina	PTGES2	PTGS1	3

4.1.3- Genes modulados pela presença da célula MDA-MB231 em fibroblastos comprometidos FN(+) e não comprometidos FN(-), exclusivamente ou concomitantemente.

Realizamos um Diagrama de Venn utilizando os genes diferencialmente expressos em fibroblastos em ambas comparações para determinar quais os genes comumente ou exclusivamente modulados pela célula MDA-MB231 em fibroblastos de linfonodo comprometido ou não comprometido.

Diagrama de Venn A : Número de genes diferencialmente expressos

Figura 11- Diagramas de Venn A: Número de genes diferencialmente expressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos [FN(+)] e não comprometidos [FN(-)] em co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB231) quando comparados aos fibroblastos de linfonodo comprometido mantidos isolados [FN(+)/MDA/FN(+)] ou não comprometido mantidos isolados [FN(-)/MDA/FN(-)]. Os genes comumente modulados podem ser visto na área de intersecção.

Cento e vinte (120) genes foram comumente modulados em fibroblastos de linfonodo comprometido ou não quando co-cultivado com célula cancerosa de mama, sendo que trinta e um (31) genes foram

hipoexpressos e oitenta e dois (82) genes hiperexpressos (Figura 11). Entretanto sete genes apesar de comumente modulados em ambas análises foram em sentido opostos, sendo que em fibroblastos de linfonodo comprometido quando co-cultivado com célula cancerosa de mama [FN(+)/MDA vs FN(+)] os genes MR3-GN0185-009-F01, EDG1, C1GALT1C1, PTPN18, PIK3CA e BCAT2 foram hipoexpressos e RC2-MT0148-019-D02 foi hiperexpressos em fibroblastos de linfonodo não comprometido quando co-cultivado com célula cancerosa de mama [FN(-)/MDA vs FN(-)] ocorre a modulação no sentido inverso (Figura 12).

Fibroblastos de linfonodo não comprometido quando co-cultivado com célula cancerosa de mama [FN(-)/MDA vs FN(-)] apresentam duzentos e noventa e cinco (295) genes modulados exclusivamente nesta condição, sendo cento e quarenta e três (143) genes hipoexpresso e cento e cinquenta e dois (152) genes hiperexpressos (Figura 12).

Fibroblastos de linfonodo comprometido quando co-cultivado com célula cancerosa de mama [FN(+)/MDA vs FN(+)] apresentam seiscentos e cinquenta e nove (659) genes modulados exclusivamente nesta condição, sendo trezentos e oito (308) genes hipoexpressos e trezentos e cinquenta e um (351) genes hiperexpressos (Diagrama de Venn B e C)

Diagrama de Venn B : Número de genes hipoexpressos **Diagrama de Venn C : Número de genes hiperexpressos**

Figura 12 - Diagramas de Venn B: Número de genes hipoexpressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos [FN(+)] e não comprometidos [FN(-)] em co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB231) quando comparados aos fibroblastos de linfonodo comprometido mantidos isolados [FN(+)-MDA/FN(+)] ou não comprometido mantidos isolados [FN(-)-MDA/FN(-)]. C: Número de genes hiperexpressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos [FN(+)] e não comprometidos [FN(-)] em co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB231) quando comparados aos fibroblastos de linfonodo comprometido mantidos isolados [FN(+)-MDA/FN(+)] ou não comprometido mantidos isolados [FN(-)-MDA/FN(-)]. Os genes comumente modulados podem ser visto na área de intersecção

4.2 – Comparação da expressão gênica resultantes de duas análises estatísticas (Test T e ANOVA) originadas de dados de cDNA microarray para escolha de genes candidatos para análise por qRT-PCR.

Para seleção dos genes diferencialmente expressos pela análise de cDNA microarray para uma reanálise de sua expressão por qRT-PCR utilizamos ainda outra análise estatística, isto é o teste de variâncias ANOVA seguido de teste de Tukey.

No teste de variância ANOVA foram determinados genes diferencialmente expressos considerando-se todas as comparações:

- ✓ fibroblasto comprometido comparado com não comprometido [FN(+) vs FN(-)],
 - ✓ fibroblasto não comprometido co-cultivado com MDA-MB231 comparado com fibroblastos não comprometido [FN(-)/MDA vs FN(-)],
 - ✓ fibroblastos comprometidos co-cultivado com MDA-MB231 comparado com fibroblastos não comprometido [FN(+)/MDA vs FN(-)],
 - ✓ fibroblastos não comprometido co-cultivado com MDA-MB231 comparado a fibroblasto comprometido [FN(-)/MDA vs FN(+)],
 - ✓ fibroblasto comprometido co-cultivado com MDA-MB231 comparado com fibroblastos comprometido [FN(+)/MDA vs FN(+)] e
 - ✓ fibroblastos comprometido co-cultivado com MDA-MB231 e fibroblastos não comprometido também co-cultivado com MDA-MB231 [FN(+)/MDA vs FN(-)/MDA].
-

Quarenta e dois (42) genes foram considerados diferencialmente expressos em pelo menos uma das comparações realizadas (tabela anexo). A expressão diferencial variou de 1,24 a 3,99 vezes e todos os genes foram diferencialmente expressos em mais de uma situação analisada. A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado, utilizando a expressão diferencial desses 42 genes classificou corretamente os fibroblastos monocultivados daqueles co-cultivados (Figura 13)

Comparando os genes diferencialmente expressos obtidos no teste ANOVA e teste t pareado observamos que trinta e um (31) genes são comuns, sendo 8 genes comuns entre FN(-)/MDAvsFN(-) e dezenove (19) genes comuns FN(+)/MDAvsFN(+) (tabela 12).

Tabela 12 – Genes diferencialmente expressos em fibroblastos co-culturado com célula epitelial maligna identificado pelo teste ANOVA ou teste T pareado.

Genes	ANOVA	TESTE T	
		FN(-)/MDAvsFN(-)	FN(+)/MDAvsFN(+)
BMI1	X		
HECTD1	X		
DNAJC12	X		
DCUN1D4	X		
C1orf108	X		
CALU	X		
MRC2	X		
MR2-EN0093-001-E11	X		
C22orf9	X		
DAP3	X		
ATP6V1A	X		
ANK2	X	X	
PSMB9	X	X	
PSMA5	X	X	
AKAP8L	X	X	
TM9SF3	X	X	
ZSCAN12	X	X	
CREG1	X	X	
PRMT2	X	X	
N4BP1	X		X
RBM28	X		X
ATF6	X		X
UBE1DC1	X		X
NCKAP1L	X		X
QV2-LT0039-107-H08	X		X
GPR98	X		X
RCOR3	X		X
METTL6	X		X
TOM1	X		X
COPE	X		X
MRPS2	X		X
MAP1LC3B	X		X
SRCAP	X		X
MAP2K3	X		X
CLIP2	X		X
MAP3K12	X		X
TMEM112B	X		X
LRP3	X		X
GPBP1	X	X	X
EDG1	X	X	X
FOXN3	X	X	X
C6orf170	X	X	X

Figura 13 - Análise de Agrupamento Hierárquico não supervisionado de 3 amostras de fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB-231), e de 3 amostras de fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos em cultura isoladamente. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

4.3- Análise da expressão gênica em fibroblastos de linfonodo por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR).

Os genes selecionados para ter sua expressão avaliada por qRT-PCR foram aqueles identificados em ambas análises (TestT pareado e ANOVA) e variação de expressão maior que 2 vezes. Esses genes foram AKAP8L, CREG1 e MAP2K3.

Nesta parte do trabalho incluímos amostras obtidas de pacientes com câncer de mama, cinco de fibroblastos de linfonodo comprometidos [FN(+)], cinco amostras de fibroblastos de linfonodo sem qualquer comprometimento [FN(-)]. Seis destas amostras foram previamente utilizadas nos ensaios de cDNA microarray, entretanto aquelas agora analisadas são provenientes de novos ensaios de monocultura e co-cultura.

Para determinar se diferentes linhagens de câncer de mama influenciam a expressão gênica de fibroblastos as dez amostras foram co-cultivadas com as linhagens de câncer de mama MDA-MB231 [FN(-)/231], MDA-MB435 [FN(-)/435] e MCF-7 [FN(-)/7].

Os fibroblastos foram cultivados em até três passagens consecutivas e as células recuperadas para os experimentos, os resultados apresentados correspondem a uma passagem (10% dos casos), duas passagens (42,5% dos casos) ou três passagens (47,5% dos casos). Para determinar a expressão gênica relativa calculou-se a média dos resultados obtidos com as células provenientes de passagens consecutivas. Este cuidado foi tomado na tentativa de minimizar o efeito de pequenas variações que ocorrem durante o cultivo celular, apesar do uso de meio de cultura padronizado para todos e mesmo lote de soro.

Para comparar juntamente a expressão gênica entre fibroblastos comprometidos ou não e entre monoculturas e co-cultura com diferentes células cancerosa utilizamos uma “Análise de Variâncias com Dois Fatores para Medidas Repetidas”, sendo a monocultura e co-cultura o fator de repetição e o fibroblasto oriundo de linfonodo comprometimento ou não o fator fixo. Sendo considerado para o teste o nível de significância de 5%. Foram utilizadas correções de Huynh-Feldt quando a esfericidade da matriz de correlação não foi satisfeita.

Os gráficos 14, 15 e 16 demonstram a média e erro padrão da expressão gênica relativa de AKAP8L, CREG1 e MAP2K3 consecutivamente em fibroblastos de linfonodo não comprometido [FN(-)] em monocultura ou em co-cultura com MDA-MB231, MDA-MB435 e MCF-7 e fibroblasto de linfonodo comprometido [FN(+)] em monocultura ou em co-cultura com MDA-MB231, MDA-MB435 e MCF-7.

Figura14 – Gráfico com valores médios e erros padrões da expressão relativa de AKAP8L em fibroblastos de linfonodo não comprometido [FN(-)] em monocultura ou em co-cultura com MDA-MB231[FN(-)/MDA231], MDA-MB435 FN(-)/MDA435 e MCF-7 FN(-)/MCF-7 e fibroblasto de linfonodo comprometido [FN(+)] em monocultura ou em co-cultura com MDA-MB231 [FN(+)/MDA231], MDA-MB435 [FN(+)/MDA435] e MCF-7 [FN(+)/MCF-7]

Figura 15 – Gráfico com valores médios e erros padrões da expressão relativa de CREG1 em fibroblastos de linfonodo não comprometido [FN(-)] em monocultura ou em co-cultura com MDA-MB231 [FN(-)/MDA231], MDA-MB435 FN(-)/MDA435 e MCF-7 FN(-)/MCF-7 e fibroblasto de linfonodo comprometido [FN(+)] em monocultura ou em co-cultura com MDA-MB231 [FN(+)/MDA231], MDA-MB435 [FN(+)/MDA435] e MCF-7 [FN(+)/MCF-7].

Figura 16 – Gráfico com valores médios e erros padrões da expressão relativa de MAP2K3 em fibroblastos de linfonodo não comprometido [FN(-)] em monocultura ou em co-cultura com MDA-MB231 [FN(-)/MDA231], MDA-MB435 FN(-)/MDA435 e MCF-7 FN(-)/MCF-7 e fibroblasto de linfonodo comprometido [FN(+)] em monocultura ou em co-cultura com MDA-MB231 [FN(+)/MDA231], MDA-MB435 [FN(+)/MDA435] e MCF-7 [FN(+)/MCF-7].

A análise de variâncias com dois fatores demonstrou que para todos os três genes analisados não houve diferença na expressão entre FN(+) e FN(-). ($p > 0,05$). Em relação a monoculturas e co-culturas somente a média da expressão de MAP2K3 apresentou diferença estatística ($p < 0,001$). Neste caso onde encontramos diferença estatística significativa foram realizadas comparações múltiplas de Bonferroni para verificar qual co-cultura tem diferença de expressão em relação a monocultura. Observamos que MAP2K3 tem sua expressão aumentada tanto em FN(-) quanto em FN(+) quando co-cultivado com MDA-MB231 ($p < 0,004$), porém com as outras linhagens utilizadas isto não ocorre.

Esses dados nos levam a inferir que a célula epitelial cancerosa MDA-MB231 é capaz de modular a expressão do gene MAP2K3 tanto em fibroblastos de linfonodo que já teve um primeiro contato com célula epitelial *in vivo* quanto em fibroblasto que não tiveram nenhum contato com célula epitelial.

Realizamos então uma análise *in silico* para determinar os potenciais sítios de ligação de fatores de transcrição presentes na região promotora do gene. Para isto utilizamos a seqüência de 1Kb da região promotora do gene recuperada no programa human Blat Search (<http://genome.brc.mcw.edu/cgi-bin/hgBlat>) e analisada no programa AliBaba 2.1 (<http://www.gene-regulation.com>).

DISCUSSÃO

A abordagem das interações entre células epiteliais e estromais no desenvolvimento do tumor vem sendo bastante enfatizada, contudo as interações que ocorrem entre células epiteliais e estromais no microambiente linfonodal é menos abordada. Além disso, trabalhos que tratam sobre essa interação focaram a influência da célula estromal sobre a epitelial (Hasebe *et al.*, 2000; Bemis & Schedin, 2000), mas não encontramos estudos semelhantes ao nosso, avaliando a influência da célula epitelial maligna na expressão gênica de célula estromais no microambiente linfonodal.

O comprometimento linfonodal é o fator prognóstico mais importante em cânceres de mama, entretanto não se sabe ainda quais os fatores envolvidos no desenvolvimento do tumor neste sítio, e os fibroblastos do linfonodo podem ter um papel significativo neste processo. Além disso, as células de câncer de mama podem influenciar a expressão gênica das células estromais presente no linfonodo, e deste modo tornar o microambiente mais ou menos favorável ao desenvolvimento de metástase. Para analisar este aspecto estabelecemos a co-cultura de fibroblastos de linfonodos comprometidos e não comprometidos com células epiteliais de câncer de mama e analisamos se existiam variações na expressão gênica destas células.

Analisamos o perfil gênico de fibroblastos de linfonodos comprometidos de três pacientes com câncer de mama e de fibroblastos de linfonodos não comprometidos de outras três pacientes, cujos linfonodos foram todos considerados livres da doença ao exame histopatológico. Para esta análise utilizamos uma plataforma de cDNA microarray que tem como característica principal o uso da tecnologia ORESTES (“Open Reading Frame Expressed Sequence Tags”) (Brentani *et al.*, 2005). Uma análise semelhante foi realizada

na tese de Doutorado de Rosângela Portilho Costa Santos. No presente estudo re-analisamos os dados usando um teste estatístico pareado, sendo que as mesmas amostras de fibroblastos foram cultivadas na presença ou ausência de célula MDA-MB231.

Observamos que a presença da célula cancerosa regula a expressão de grande número de genes tanto de linfonodo comprometido como não comprometido, indicando que a célula cancerosa exerce influência na célula estromal adjacente. Este perfil gênico determina a clara segregação dos fibroblastos mantidos em co-cultura com célula cancerosas daqueles mantidas em monocultura. É interessante notar que um maior número de genes são regulados em fibroblastos de linfonodos comprometidos quando co-cultivados com células epiteliais do que em fibroblastos de linfonodos não comprometidos. Apesar disso as células MDA-MB231 tendem a regular na mesma proporção (tanto positivamente quanto negativamente) a expressão gênica de fibroblastos de linfonodos comprometidos ou não comprometidos.

Observamos que a célula mamária maligna modula a expressão de 120 genes em fibroblastos independente se originários de linfonodo comprometido ou não, dos quais 82 foram hipoexpressos, indicando que a célula mamária maligna possa secretar fatores que causam a repressão da expressão gênica em fibroblastos. Dentre os genes cuja expressão foi reprimida em ambos os fibroblastos em co-cultura encontram-se CHD8 (*chromodomain helicase DNA binding protein 8*) envolvida na remodelação da cromatina e modificação de histonas, com função de ativação de transcrição de promotores tipo 3 de polimerase III e ACTR10 (*actin-related protein 10 homolog /S. cerevisiae*) gene que codifica uma proteína de filamento que compõem o citoesqueleto. Como

estes genes foram modulados pela célula epitelial cancerosa tanto em fibroblastos comprometido quanto em não comprometido podemos supor que eles sejam permissivos ao desenvolvimento da célula epitelial cancerosa no microambiente linfonodal.

Identificamos também algumas funções e vários genes cuja expressão foi unicamente modulada em fibroblastos de linfonodos comprometidos [FN(+)] ou fibroblastos de linfonodos não comprometidos [FN(-)], quando mantidos em co-cultura com a célula MDA-MB231, sugerindo que possam existir alguns genes que são preferencialmente regulados em uma situação específica.

Inicialmente iremos analisar as funções e então genes específicos modulados em fibroblastos de linfonodos não comprometidos.

A presença de células cancerosas pode interferir em algumas funções dos fibroblastos de linfonodos não comprometidos [FN(-)], como a tradução, incluídas nesta há genes que codificam algumas proteínas ribossomais que foram diferencialmente expressos, sendo dois hiperexpressos (RPL3, RPL32P3) e outros quatro hipoexpressos (C15orf15, RPL18, MRPL22 e MRPS21) nas células estromais. RPL3 (*60S ribosomal protein L13*) e RPL18 (*ribosomal protein L18*) codificam proteínas ribossomais da subunidade 60S. C15orf15 (*60S ribosomal protein L30 isolog*) codifica uma proteína semelhante a RPL24 e RPL30 (proteína ribossômica) e MRPL22 (*mitochondrial ribosomal protein L22*) e MRPS21 (*mitochondrial ribosomal protein L21*) codificam proteínas ribossomais mitocondriais que auxiliam a síntese de proteína dentro das mitocôndrias. Duas formiltransferase, GART (*phosphoribosylglycinamide formyltransferase*) e MTFMT (*mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase*) se apresentaram hipoexpressas em fibroblastos de linfonodos não

comprometidos indicando que a célula MDA-MB231 inibiu a atuação dessa enzima em fibroblastos.

Outra função regulada foi a de transmissão de sinal por receptor de superfície, incluindo receptores ligantes de citocinas como IL18RAP (*interleukin 18 receptor accessory protein*) hiperexpresso e IFNAR1 (*interferon alpha, beta and Omega- receptor 1*) hipoexpresso em fibroblastos não comprometidos quando co-cultivados com células de câncer de mama. Além disso, também observamos a modulação gênica de alguns receptores de superfície e proteínas associadas, como hiperexpressão de CD59 (*complement regulatory protein*) e CBLB (*Cas-Br-M- murine- ecotropic retroviral transforming sequence b*); assim como a hipoexpressão de PLAUR (*plasminogen activator, urokinase receptor*), NPR2 (*natriuretic peptide receptor 2*), TTRAP (*TRAF and TNF receptor associated protein*) e MAGI1 (*membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1*) em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivado com MDA-MB231.

Detectamos que a célula MDA-MB231 causa a regulação de alguns genes em fibroblastos de linfonodos não comprometidos, sendo esta situação experimental a que mais se aproxima do que acontece no microambiente *in vivo* do linfonodo no primeiro contato com a célula tumoral. Dentre os genes diferencialmente expressos encontra-se TSC22D3, CIB1, JAK2, SH3GLB1 e ALDH1A3 relacionados a apoptose; MAD2L2, TACC1, ROCK2 e CLASP2 relacionados à divisão celular; RGS2, UBE1C, HRAS, CHPT1 e HECTD3 relacionados ao ciclo celular e CREG1, CDC2L5 e SMAD3 relacionados à proliferação celular.

CIB1 (*calcium and integrin binding 1*), foi encontrado hipoexpresso em fibroblastos co-cultivados, este gene foi descrito com potencial para ativar angiogênese patológica (Zayed *et al.*, 2007) que é importante para o desenvolvimento de tumores, mas no microambiente linfonodal essa função pode não ser importante para o estabelecimento do tumor ou progressão de metástase.

Dentre os genes regulados positivamente em fibroblastos de linfonodos não comprometidos [FN(-)/MDA], encontram-se JAK2, SH3GLB1, SMAD3 e ABCC4. É interessante observar que alguns genes modulados em fibroblastos mediante a presença de célula MDA-MB231 foram previamente identificados como diferencialmente expressos em tumores mesenquimais.

JAK2 (*Janus kinase 2*) está amplificado em linhagem celular de fibrosarcoma de rato e codifica uma proteína tirosino quinase que se associa com o receptor de prolactina que também está envolvido em respostas a interferon gama (Sjoling *et al.*, 2001). A interdependência recíproca entre JAK1 e JAK2 na via do interferon-gama pode refletir um requisito para estas tirosino quinases no agrupamento correta de complexos de receptor para interferon, além do mais, JAK1 foi achado hipoexpressas em Sarcoma de Ewing's (Baird *et al.*, 2005), apontando para a importância destes quinases no desenvolvimento de sarcomas.

SH3GLB1 ou Bif-1 (*SH3-domain GRB2-like endophilin B1*) interage com Bax e promove apoptose, logo sua perda impede a ativação de Bax, inibindo apoptose.

SMAD3 (*SMAD family member 3*) é membro de uma família de proteínas envolvidas na via de TGF β que inibe diferenciação miogênica. Demonstrou-se

previamente sua expressão aumentada em linhagem de rabdomiosarcoma em comparação com mioblastos (Wang *et al.*, 2003)

ABCC4 (*ATP-binding cassette, sub-family C, member 4*) codifica uma proteína associada a resistência a múltiplas drogas e foi hiperexpressos em tumor estromal gastrointestinal (Nielsen *et al.*;2002).

Analizamos a seguir a influência da célula MDA-MB231 na expressão gênica de fibroblastos de linfonodos comprometidos [FN(+)], sendo que algumas funções biológicas foram moduladas, entre elas a regulação negativa da motilidade celular, porém destacando-se o ciclo celular, onde 21 genes foram hipoexpressos (RIF1, CDCA8, PRC1, NEK9, FOXN3, RASSF4, CDKN2C, CDK6, MAPK13, TFDP1, STRN3, NCAPD2, ATM, APC, POLS, BIN1, CNTROB, NF2, S100A6, PTP4A1 e NBN) e 15 genes foram hiperexpressos (RCBTB1, RGS2, FAM33A, MAD2L2, BCL10, MAEA, CDKN1B, CDK7, CHAF1A, CDC14A, CUL3, CUL4A, ANLN, BUB1B e STARD13).

Dentre os genes envolvidos no ciclo celular hipoexpressos em fibroblastos encontram-se S100A6, BIN1e NF2. S100A6 (*S100 calcium binding protein A6*) está presente tanto em célula epitelial como em fibroblastos de vários tecidos, inclusive o de mama (Kuźnicki *et al.*, 1992), é hipoexpressos em osteosarcoma e a perda de sua expressão pode estar relacionada ao fenótipo metastático (Luu *et al.*, 2005).

BIN1 (*bridging integrator 1*) parece ser um supressor de tumor e a ausência de sua expressão em fibroblasto murino transformado por Myc e Ras confere vantagem proliferativa à célula (Muller *et al.*, 2004).

NF2 (*neurofibromin 2 -merlin*) também é um gene supressor de tumor e em estudos com fibroblastos NIH3T3 demonstraram que NF2 se liga ao

receptor de Gr2 (receptor de fator de crescimento 2) inibindo sua expressão, sugerindo que NF2 inibe a via de quinases que acarreta na proliferação anormal da célula (Lim *et al.*, 2006).

Dentre os genes diferencialmente expressos em fibroblastos de linfonodo comprometido mantidos em co-cultura (variação de expressão ≥ 2 vezes) incluem - se DAPK1, HSP90B1, NGFRAP1, GZMB, ATG13, PTPRC, DNAJA3 AXUD1, IL1B, ACTN4, AKT1S1 e FAIM2, envolvidos em apoptose; GTF2A2, CHD8, FUBP1, CHAF1A, ZNF335, ZNF189, MED4 e ZHX2F, CXXC1, ATF7, MAP2K3, MBD3, POLR2A, FOXN3, SF1 e MLLT1 envolvidos em regulação da transcrição dependente de DNA; MAP2K3, FOXN3, DNAH1, IL1B, RAD23A, ERFFI1, HSP90B1, C1QB, UBE2V2, CHAF1A, HMCN1 e XRCC6BP1 envolvidos em resposta a stress; dentre outros. É possível que alguns desses genes modulados tenham relação com um tipo de resposta secundária desenvolvida por estes fibroblastos de linfonodos comprometidos, em uma fase da doença em que a metástase regional já se encontra estabelecida.

Para confirmar se alguns genes selecionados seriam regulados especificamente em fibroblastos de linfonodos, analisamos sua expressão em um número maior de amostras, incluindo-se material de mais duas diferentes pacientes, totalizando cinco amostras em cada grupo, e utilizando células obtidas de até três passagens celulares sucessivas e a tecnologia de RT-PCR em tempo real. Além disso, pra determinar se a regulação destes genes pode ser exercida por célula de câncer de mama em geral, isto é, se esta influência é independente da linhagem utilizada foram realizadas co-culturas dos fibroblastos com células MDA-MB231, MDA-MB435 e MCF-7.

Esses novos ensaios totalizam um maior número de amostras de fibroblastos co-cultivados na presença de diferentes linhagens de câncer de mama (MDA-MB231, MDA-MB435 e MCF-7).

Nossos dados iniciais em cDNA microarray sugerem a hipoexpressão de CREG1 e AKAP8L em fibroblastos de linfonodo não comprometido co-cultivado [FN(-)/MDA], mas estes dados não foram confirmados em ensaios de qRT-PCR, em quaisquer comparações focadas, seja fibroblastos de linfonodo comprometido versus não comprometido ou monocultura versus co-culturas.

CREG1 (*cellular repressor of E1A-stimulated genes 1*) codifica uma proteína que antagoniza a ativação transcricional e diferenciação celular exercida pela proteína E1A de adenovírus. Esta proteína compartilha semelhança com E1A e se liga ao fator de transcrição TBP e supressor de tumor pRb, *in vitro*. A atividade de CREG1 contribui para o controle da proliferação e diferenciação celular em linhagens (Di Baco *et al.*, 2003; Sacher *et al.*, 2005; Ishida *et al.*, 2007). AKAP8-L (*A-quinase anchor protein 8-like protein*) ou HA95 codifica uma proteína homóloga a AKAP95, que é uma proteína de ancoragem nuclear, envolvida na interação entre cromatina e envelope nuclear (Orstavik *et al.*, 2000; Landsverk *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2003).

As diferenças de expressão gênica encontradas nos ensaios de cDNA microarray e qRT-PCR em amostras de fibroblastos de linfonodos, não devem ter sido causadas por condições de cultura, pois foram utilizados o mesmo meio de cultura e mesmo lote de soro em todos os ensaios. Estas diferenças também não devem ser resultantes de diferentes passagens celulares em

cultura, pois os fibroblastos utilizados nestes ensaios encontravam-se ainda em passagens precoces de cultivo, da terceira à décima quinta passagens.

Nossos dados iniciais de cDNA microarray mostra que MAP2K3 foi hiperexpressa em fibroblastos de linfonodo comprometido co-cultivado com célula MDA-MB231, mas uma análise mais abrangente em um número maior de amostras qRT-PCR revela sua expressão em fibroblastos de linfonodo comprometido e não comprometido co-cultivado com MDA-MB231 quando comparado a monocultura. No entanto essa modulação não foi observada em fibroblasto de linfonodo comprometido ou não quando co-cultivados com as células MDA-MB435 e MCF-7. Esperávamos que as células MDA-MB435 e MDA-MB231 causassem alterações semelhantes na expressão gênica dos fibroblastos, pois estas células têm algumas características semelhantes como fenótipo mesenquimal e ausência de receptores hormonais, porém a MDA-MB231 é triplo negativa e também não apresenta expressão de *erbb2* e tumores com esse fenótipo têm comportamento bastante agressivo. Além disso, a célula MDA-MB435 apresenta semelhanças com melanoma (Mikheev *et al.*, 2007).

Nossa hipótese é que a interação entre a célula MDA-MB231 e fibroblastos culmine na presença de fatores que induzam a expressão de MAP2K3 nas células estromais. Observamos a presença de 53 sítios potenciais de ligação a fatores de transcrição diferentes para MAP2K3, sendo Sp1 o mais freqüente deles. Encontramos também RXRbeta (*retinoid X receptor, beta*), RARalpha (*RAR-related orphan receptor C*), ER (*estrogen receptor 1*) e GR (*glucocorticoid receptor; nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1*). Além disso, pesquisamos a região promotora dos genes MBD3 e GBF1 que foram hiperexpressos e encontramos regiões promotoras que

também está presente em MAP2K3, como NF1 (*neurofibromin 1*), USF (*upstream transcription factor 1*), AP1 (*jun oncogene*) e WT1 (*Wilms tumor 1*).

MAP2K3 (*mitogen-activated protein kinase kinase 3*) ou também QUINASE 3; PRKMK3, MKK3, MAPKK3, MAPK/ERK QUINASE 3 ou MEK3, codifica um membro da família de proteínas MAPA-quinase-quinase que regulam sinalização extracelular (ERKs), sendo ponto de integração para múltiplos sinais bioquímicos. Essa proteína tem especificidade dúbia como indução do ciclo celular, apoptose e ativação de transcrição (Gills *et al.*, 2007; Rishi *et al.*, 2006; Kurata, 2000; Song *et al.*, 2006).

Nossos resultados indicam 33% de concordância na expressão gênica relativa avaliada por ensaios de cDNA microarray e qRT-PCR, com confirmação da maior expressão de MAP2K3 em fibroblasto de linfonodo comprometido co-cultivado com a célula MDA-MB231.

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

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

seqüência não apresenta correspondência exata com aquela presente na plataforma de cDNA microarray.

Além disso, trabalhos utilizando as mesmas amostras em ensaios de cDNA microarrays e qRT-PCR têm mostrado correlações variadas entre as técnicas. Ensaios empregando duas diferentes plataformas de cDNA microarray e também RT-PCR, utilizando alíquotas das mesmas amostras de tecido cerebral, pulmonar e hepático mostrou correlação de 34 - 40% entre os ensaios e uma anti-correlações de 6,3 - 9,6% dos genes analisados (Wang *et al.*, 2006). 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). Em outro estudo onde se avaliou a expressão gênica de fibroblastos oriundo de câncer de mama e tecido benigno de mama, por cDNA microarray, foram encontrados 135 genes hiperregulados e 38 hiporegulados em fibroblastos de câncer de mama. A expressão de quatro genes foram analisados por RT-PCR nas mesmas amostras mostrando 50% de correlação entre os resultados da expressão gênica em ambas as análise (Singer *et al.*, 2007).

Estudos de validações biológicas da expressão gênica diferencial identificada nos ensaios de cDNA microarray e utilizando um outro grupo de amostras para análise em ensaios de RT-PCR, como realizado neste trabalho, tem concordância variada. Chiu *et al.* (2005) selecionaram genes encontrados

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

É possível o perfil de expressão gênica de células estromais possa nos fornecer dados relacionados ao desenvolvimento do tumor no sítio primário e metastático. Alguns autores já demonstraram que características do estroma tumoral estão relacionados ao prognóstico da doença (Bergamashi *et al.*, 2007; West *et al.*, 2005; Micke *et al.*, 2007), Além disso, estudo recente indica que as células estromais podem apresentar alteração como mutação de p53 e perda de heterozigidade (Patocs *et al.*, 2007) alterações as quais as vezes são encontradas no próprio tumor.

Apesar de confirmar a hiperexpressão de MAP2K3 é necessário que mais genes sejam avaliados para se formular esse perfil, principalmente modulações gênicas ocorridas nos fibroblastos por quaisquer célula tumoral.

Em resumo, estudamos a influência que a célula de câncer de mama têm sobre o perfil gênico das células estromais provenientes de linfonodo de pacientes com câncer de mama. Observamos que a célula MDA-MB231 induz algumas modificações na expressão gênica destes fibroblastos, entretanto são necessários estudos adicionais para determinar se esta modulação é exercida por células de câncer de mama em geral e se estes genes candidatos são modulados nos fibroblastos linfonodais “*in vivo*”.

CONCLUSÃO

Células de câncer de mama MDA-MB231 influenciaram a expressão de vários genes em fibroblastos de linfonodos comprometidos e de linfonodos não comprometidos de pacientes com câncer de mama. A análise de agrupamento não supervisionada utilizando este perfil de expressão gênica permitiu a segregação dos fibroblastos em dois grupos distintos, fibroblastos cultivados na presença de células MDA-MB231 e fibroblastos cultivados isoladamente.

A hipoexpressão de CREG1 e AKAP8L em fibroblastos de linfonodo não comprometidos co-cultivados com células MDA-MB231 não foi reproduzida em ensaios de qRT-PCR, utilizando-se fibroblastos co-cultivados com três linhagens de câncer de mama, MDA-MB231, MDA-MB435 e MCF-7.

A presença de células MDA-MB231 induz a expressão de MAP2K3 em fibroblastos obtidos de linfonodos de pacientes com câncer de mama, mas o mesmo efeito não se observa em fibroblastos co-cultivados com outras linhagens de câncer de mama, MDA-MB435 e MCF-7. Células de câncer de mama com diferentes perfis talvez induzam respostas específicas nos fibroblastos adjacentes.

ANEXO

Tabela 13 – Genes diferencialmente expressos analisados por testeT em fibroblasto de linfonodo não comprometido [FN(+)] e fibroblasto de linfonodo não comprometido co-cultivado com célula epitelial MDA-MB231 [FN(+)/MDA], quando analisados sua expressão em lâmina de microarray, fold=variação de expresssão, p=significância, m=média e SD=desvio padrão

nº	Gene	FN(-) m	FN(-) SD	FN(-)/MDA m	F(-)/MDA SD	p	Fold
1	PM2-ST0303-002-E07	-0.53	0.19	2.65	1.07	0.03	9.04
2	TMEM154	-0.63	0.49	1.48	0.57	0.02	4.33
3	SEC63	-0.61	0.31	1.31	0.43	0.02	3.79
4	USP7	-0.65	0.2	0.95	0.73	0.04	3.03
5	FAM134C	-0.51	0.52	0.96	0.14	0.03	2.77
6	ALDH1A3	-2.7	0.47	-1.26	0.5	0.00	2.72
7	C19orf6	-0.64	0.05	0.8	0.6	0.05	2.71
8	RC4-LT0071-015-A09	-0.55	0.1	0.76	0.16	0.01	2.47
9	GPBP1	-0.37	0.15	0.93	0.6	0.04	2.47
10	TRIO	1.85	0.45	3.14	0.45	0.04	2.44
11	KIAA0310	0.35	0.22	1.6	0.31	0.02	2.39
12	POLQ	-1.69	0.59	-0.43	0.15	0.05	2.39
13	JAK2	0.12	0.25	1.37	0.16	0.01	2.37
14	FAM59A	-0.4	0.8	0.85	0.7	0.03	2.37
15	RANBP2	-1.43	0.26	-0.2	0.2	0.01	2.36
16	SRGAP1	1.17	0.19	2.38	0.06	0.01	2.32
17	NFKBIZ	0.5	0.42	1.71	0.09	0.05	2.31
18	KTELC1	0.08	0.21	1.28	0.39	0.05	2.29
19	CM1-FT0052-267-C04	-1.61	0.23	-0.43	0.31	0.01	2.26
20	DLC1	2.13	0.89	3.31	0.48	0.04	2.26
21	ROCK2	-0.54	0.33	0.63	0.22	0.00	2.25
22	AKAP12	1.11	0.28	2.28	0.24	0.04	2.25
23	RIPK4	-3.1	0.61	-1.97	0.32	0.02	2.19
24	IL4R	-0.33	0.25	0.77	0.16	0.00	2.15
25	POLR2A	-0.09	0.34	1.01	0.54	0.01	2.14
26	SMAD3	-0.27	0.78	0.8	0.72	0.00	2.11
27	PSMD3	-1.41	0.25	-0.35	0.1	0.03	2.08
28	GPR56	-3.12	0.49	-2.08	0.43	0.00	2.06
29	CBLB	1.85	0.21	2.89	0.37	0.02	2.06
30	CDC2L5	-0.63	0.57	0.41	0.44	0.02	2.06
31	THAP3	-0.77	0.15	0.27	0.37	0.03	2.05
32	SLC12A4	1.32	0.1	2.34	0.3	0.02	2.04
33	FRMD4A	2.18	0.39	3.2	0.44	0.01	2.03
34	CLASP2	-0.25	0.19	0.77	0.16	0.05	2.02
35	DENND1A	-0.49	0.51	0.52	0.34	0.01	2.01
36	SH3GLB1	0.19	0.23	1.19	0.42	0.01	2.00
37	DYNC1H1	0.86	0.11	1.85	0.06	0.01	1.99
38	LBR	-2.52	0.42	-1.55	0.38	0.04	1.95
39	CRK	-0.51	0.14	0.44	0.02	0.01	1.94
40	RC2-FN0164-015-H01	-0.82	0.07	0.13	0.14	0.01	1.93
41	QV2-PT0012-031-H06	-0.89	0.13	0.05	0.3	0.05	1.92
42	PPCS	0.00	0.04	0.93	0.38	0.04	1.91
43	JRK	-0.65	0.38	0.24	0.53	0.01	1.85
44	MR0-HT0559-012-B11	-0.2	0.16	0.68	0.3	0.03	1.85
45	POLS	-0.61	0.27	0.25	0.08	0.04	1.82
46	KLF5	-0.37	0.09	0.49	0.12	0.01	1.81
47	PTPRE	0.57	0.14	1.42	0.24	0.03	1.80
48	NAB1	0.09	0.5	0.92	0.2	0.04	1.79
49	TM9SF3	-0.07	0.22	0.76	0.13	0.02	1.78

nº	Gene	FN(-) m	FN(-) SD	FN(-)/MDA m	F(-)/MDA SD	p	Fold
50	SLC25A44	-1.12	0.12	-0.3	0.17	0.01	1.76
51	KLHL21	1.89	0.23	2.69	0.2	0.02	1.75
52	SPIN1	-0.95	0.18	-0.15	0.12	0.02	1.74
53	MR0-NN1170-302-C06	1.11	0.58	1.9	0.73	0.03	1.73
54	RC5-HT0259-031-A07	-0.79	0.22	0.00	0.37	0.04	1.73
55	SLC6A14	0.3	0.06	1.09	0.26	0.04	1.73
56	JMJD1B	-1.29	0.15	-0.51	0.22	0.03	1.71
57	ZNF212	-1.02	0.13	-0.25	0.12	0.00	1.70
58	ELAVL1	-0.69	0.29	0.08	0.1	0.02	1.70
59	UBP1	0.63	0.2	1.4	0.08	0.02	1.70
60	TARDBP	-0.9	0.23	-0.15	0.12	0.01	1.69
61	STAM2	-0.31	0.23	0.44	0.38	0.01	1.69
62	TMEM55B	-0.74	0.13	0.00	0.06	0.00	1.67
63	MYO10	1.59	0.28	2.32	0.47	0.02	1.66
64	HNRPM	0.07	0.25	0.8	0.4	0.03	1.66
65	FBXL3	-0.69	0.14	0.04	0.36	0.03	1.66
66	PM0-GN0344-008-D01	0.49	0.24	1.22	0.13	0.03	1.66
67	TSPYL1	-0.62	0.14	0.11	0.34	0.03	1.66
68	POFUT1	-0.83	0.37	-0.1	0.29	0.01	1.65
69	CTDP1	-0.37	0.22	0.35	0.08	0.02	1.65
70	MCM7	-2.52	0.19	-1.8	0.14	0.02	1.65
71	YIPF5	0.00	0.13	0.72	0.3	0.03	1.65
72	QV2-HT0577-150-F12	-0.82	0.26	-0.1	0.42	0.03	1.64
73	NR2C2	-0.32	0.28	0.39	0.15	0.03	1.64
74	CLINT1	-0.25	0.39	0.43	0.45	0.00	1.61
75	GPR34	-0.29	0.19	0.4	0.3	0.01	1.61
76	RC0-FT0077-022-G11	-0.54	0.08	0.15	0.22	0.02	1.61
77	SLN	0.32	0.23	1.00	0.22	0.02	1.59
78	AMD1	0.01	0.38	0.68	0.32	0.04	1.59
79	PRPF4B	-0.39	0.25	0.28	0.05	0.05	1.59
80	DICER1	-0.47	0.18	0.2	0.22	0.00	1.58
81	SLC39A14	1.32	0.17	1.98	0.25	0.04	1.58
82	VCAN	-0.12	0.11	0.54	0.23	0.05	1.57
83	SLTM	-1.93	0.58	-1.29	0.61	0.01	1.56
84	DNAJA2	-0.94	0.14	-0.29	0.17	0.05	1.56
85	PDIK1L	0.37	0.17	1.01	0.09	0.05	1.56
86	F11R	-1.83	0.3	-1.19	0.46	0.02	1.55
87	BCAR1	0.03	0.26	0.66	0.2	0.03	1.55
88	ABCC4	0.57	0.49	1.2	0.33	0.05	1.55
89	USP1	-1.36	0.27	-0.73	0.21	0.00	1.54
90	JARID1B	1.19	0.1	1.81	0.26	0.03	1.54
91	CENTG3	0.63	0.11	1.24	0.16	0.01	1.53
92	FBLIM1	0.09	0.41	0.7	0.27	0.02	1.52
93	ITSN2	-0.72	0.26	-0.13	0.16	0.03	1.51
94	DCBLD2	1.43	0.27	2.02	0.17	0.02	1.50
95	JMJD2A	-0.33	0.31	0.24	0.24	0.01	1.49
96	TPCN2	-0.33	0.26	0.25	0.36	0.02	1.49
97	SON	-0.29	0.15	0.28	0.2	0.04	1.49
98	SLC29A3	0.48	0.38	1.05	0.31	0.01	1.48
99	C17orf85	-0.79	0.15	-0.23	0.22	0.01	1.48
100	ZER1	0.01	0.03	0.58	0.12	0.02	1.48
101	FEM1C	0.33	0.06	0.9	0.21	0.04	1.48
102	ST14	-2.59	0.22	-2.03	0.22	0.02	1.47
103	MR3-GN0185-009-F01	-0.57	0.16	-0.02	0.16	0.05	1.47

nº	Gene	FN(-) m	FN(-) SD	FN(-)/MDA m	F(-)/MDA SD	p	Fold
104	IQCE	-0.02	0.14	0.52	0.19	0.00	1.46
105	ZDHHC9	0.59	0.11	1.14	0.21	0.01	1.46
106	C15orf48	-0.71	0.16	-0.17	0.17	0.04	1.46
107	SAMD9	-0.41	0.11	0.13	0.19	0.04	1.46
108	B4GALNT1	-0.01	0.03	0.54	0.18	0.04	1.46
109	TRAF3IP2	-1.73	0.44	-1.19	0.25	0.04	1.46
110	TIPRL	-0.79	0.08	-0.25	0.22	0.03	1.45
111	FAM130A1	0.06	0.08	0.59	0.16	0.03	1.44
112	LOC284620	-0.57	0.04	-0.05	0.02	0.00	1.43
113	GRIN2B	0.21	0.25	0.72	0.26	0.00	1.43
114	ALS2	0.03	0.23	0.55	0.13	0.05	1.43
115	PHLDB1	2.07	0.3	2.58	0.31	0.01	1.42
116	TEX10	-0.24	0.08	0.26	0.13	0.01	1.42
117	DDEF1	0.1	0.44	0.61	0.6	0.03	1.42
118	C1orf66	-0.78	0.05	-0.29	0.11	0.00	1.40
119	ZSCAN12	-0.23	0.2	0.25	0.17	0.00	1.40
120	EDG1	-0.74	0.11	-0.27	0.08	0.00	1.39
121	SPG3A	-1.21	0.05	-0.74	0.07	0.02	1.39
122	PPP1R13B	-0.85	0.05	-0.37	0.1	0.03	1.39
123	CM0-CN0039-166-D05	0.03	0.14	0.5	0.26	0.04	1.39
124	TBL3	-0.31	0.19	0.15	0.19	0.00	1.38
125	ZXDC	-1.82	0.26	-1.36	0.15	0.02	1.38
126	TLR9	-0.57	0.13	-0.11	0.28	0.04	1.38
127	CENTG2	0.04	0.09	0.49	0.22	0.05	1.37
128	WDHD1	-1.18	0.17	-0.73	0.18	0.00	1.36
129	MR1-HT1068-008-G06	-0.66	0.25	-0.22	0.1	0.05	1.36
130	TTC7A	-1.06	0.08	-0.63	0.23	0.05	1.35
131	ABL2	-0.03	0.2	0.4	0.15	0.01	1.34
132	ACOX2	-0.29	0.25	0.14	0.3	0.04	1.34
133	KIAA0664	-0.5	0.15	-0.09	0.16	0.00	1.33
134	RARS2	-0.35	0.18	0.05	0.29	0.02	1.33
135	QV2-NN0045-517-C06	0.52	0.1	0.93	0.22	0.03	1.33
136	IL3-CT0219-059-G05	-0.48	0.15	-0.06	0.11	0.03	1.33
137	TAF2	-1.07	0.38	-0.65	0.26	0.03	1.33
138	FOXN3	-0.03	0.06	0.39	0.1	0.03	1.33
139	FEZ2	-0.14	0.17	0.26	0.16	0.02	1.32
140	ATP6V0A2	-0.23	0.4	0.16	0.37	0.00	1.31
141	FYT1D1	-0.5	0.37	-0.11	0.39	0.02	1.31
142	PHF1	-0.15	0.11	0.24	0.04	0.04	1.31
143	AP3M2	0.12	0.07	0.52	0.19	0.05	1.31
144	STRAP	-1.14	0.38	-0.76	0.33	0.01	1.30
145	CTNND2	-0.03	0.17	0.34	0.29	0.03	1.30
146	SUDS3	-0.22	0.11	0.16	0.16	0.04	1.30
147	HSPA12A	1.17	0.17	1.56	0.04	0.05	1.30
148	C1GALT1C1	0.47	0.25	0.84	0.16	0.02	1.29
149	CM3-HT0769-197-H04	-1.07	0.19	-0.71	0.2	0.02	1.29
150	HOXB9	-1.29	0.23	-0.93	0.34	0.03	1.29
151	CYP26B1	0.38	0.14	0.75	0.03	0.04	1.29
152	MR1-ST0206-002-F06	-0.71	0.09	-0.35	0.14	0.01	1.28
153	SASP	-0.24	0.05	0.11	0.08	0.04	1.28
154	CD59	-1.27	0.09	-0.94	0.18	0.03	1.26
155	C15orf44	-1.03	0.07	-0.71	0.05	0.02	1.25
156	PTPN18	0.14	0.25	0.45	0.05	0.05	1.25
157	DFNA5	-0.11	0.08	0.2	0.1	0.01	1.24

nº	Gene	FN(-) m	FN(-) SD	FN(-)/MDA m	F(-)/MDA SD	p	Fold
158	C20orf59	-0.11	0.11	0.2	0.14	0.01	1.24
159	TIMELESS	2.61	1.22	2.9	1.17	0.01	1.23
160	FREQ	-0.45	0.2	-0.15	0.25	0.04	1.23
161	WWC3	0.02	0.69	0.31	0.77	0.03	1.22
162	PIK3CA	0.04	0.18	0.33	0.12	0.04	1.22
163	NOTCH1	-0.4	0.16	-0.12	0.22	0.05	1.22
164	GTPBP10/QV1-UM0105-189-H02	0.11	0.19	0.37	0.12	0.02	1.20
165	ACAD10	0.01	0.05	0.26	0.09	0.01	1.19
166	RPL3	-0.08	0.03	0.18	0.04	0.02	1.19
167	SEPT4	0.02	0.05	0.27	0.11	0.03	1.19
168	CYP24A1	0.22	0.17	0.48	0.13	0.03	1.19
169	ALG9	-0.24	0.21	0.01	0.27	0.03	1.19
170	TRIOBP	-0.09	0.12	0.16	0.22	0.05	1.19
171	IKBKAP	-0.32	0.1	-0.08	0.13	0.02	1.18
172	CX3CL1	-0.15	0.26	0.08	0.29	0.04	1.18
173	BCAT2	0.00	0.04	0.23	0.05	0.04	1.17
174	CM1-NN1006-185-B10	0.14	0.12	0.36	0.1	0.02	1.16
175	MGC15523	-0.02	0.1	0.2	0.07	0.03	1.16
176	CCNJ	-0.08	0.2	0.13	0.13	0.03	1.15
177	IL18RAP	-0.07	0.15	0.12	0.15	0.04	1.15
178	SLC13A3	0.11	0.15	0.32	0.12	0.04	1.15
179	RPL32P3	-0.1	0.04	0.09	0.04	0.01	1.14
180	WASF3	0.01	0.14	0.19	0.11	0.01	1.14
181	RBM15B	-0.23	0.14	-0.03	0.13	0.01	1.14
182	WDR74	-0.23	0.06	-0.04	0.02	0.02	1.14
183	CCDC8	0.29	0.33	0.45	0.36	0.01	1.12
184	CM1-PT0016-075-C01	0.03	0.13	0.19	0.13	0.02	1.12
185	RAPGEF1	-0.08	0.12	0.08	0.18	0.05	1.12
186	JMJD1C	-2.31	0.56	-2.19	0.58	0.04	1.08
187	ODC1	-0.43	0.23	-0.35	0.22	0.02	1.06
188	ZC3H7A	-0.66	0.1	-0.61	0.11	0.02	1.03
189	B3GAT2	-0.04	0.01	-0.02	0.01	0.00	1.01
190	MR1-NT0179-001-H11	0.13	0.1	0.11	0.13	0.00	-1.01
191	UBE3A	-0.04	0.02	-0.14	0.02	0.00	-1.07
192	ZNF3	-0.14	0.09	-0.23	0.08	0.02	-1.07
193	CM0-NN0135-457-D01	-0.11	0.06	-0.21	0.06	0.03	-1.07
194	MR2-NN1111-006-G09	0.14	0.04	0.04	0.01	0.04	-1.07
195	LGALS3	0.37	0.08	0.26	0.05	0.05	-1.07
196	MDN1	0.17	0.14	0.06	0.16	0.02	-1.08
197	RPS6KA2	0.23	0.11	0.11	0.13	0.01	-1.09
198	GART	0.03	0.04	-0.1	0.01	0.02	-1.09
199	RECQL5	0.12	0.28	-0.01	0.24	0.03	-1.09
200	FBXO7	0.03	0.05	-0.09	0.01	0.05	-1.09
201	OAZ2	0.14	0.03	0.01	0.08	0.05	-1.09
202	LPHN3	0.09	0.09	-0.05	0.1	0.00	-1.10
203	AGPAT3	-0.4	0.06	-0.53	0.06	0.02	-1.10
204	TMUB1	0.15	0.14	-0.01	0.15	0.00	-1.11
205	CM0-NN0135-451-D06	0.08	0.09	-0.06	0.07	0.01	-1.11
206	PTPRS	0.01	0.14	-0.16	0.14	0.00	-1.12
207	RC2-MT0148-019-D02	0.25	0.16	0.08	0.19	0.01	-1.12
208	VPS39	0.23	0.12	0.07	0.17	0.04	-1.12
209	MR3-ST0220-104-G05	0.45	0.1	0.28	0.05	0.04	-1.13
210	IL1R2	0.17	0.16	-0.02	0.13	0.02	-1.14
211	PCYOX1L	0.08	0.11	-0.11	0.08	0.02	-1.14

nº	Gene	FN(-) m	FN(-) SD	FN(-)/MDA m	F(-)/MDA SD	p	Fold
212	BCL9	0.21	0.15	0.01	0.15	0.05	-1.14
213	EPS15L1	0.19	0.08	-0.01	0.08	0.01	-1.15
214	AGTR2	0.16	0.05	-0.05	0.1	0.03	-1.15
215	KIAA1598	-0.37	0.13	-0.57	0.12	0.05	-1.15
216	QPCTL	0.05	0.08	-0.16	0.07	0.04	-1.16
217	INPP1	-1.71	0.21	-1.96	0.16	0.02	-1.18
218	TNRC6A	0.39	0.13	0.14	0.15	0.02	-1.19
219	RGS3	0.03	0.2	-0.22	0.16	0.03	-1.19
220	NTRK3	0.03	0.1	-0.22	0.09	0.05	-1.19
221	IFNAR1	0.00	0.16	-0.28	0.26	0.05	-1.21
222	PFKFB2	0.07	0.17	-0.21	0.25	0.03	-1.22
223	MYO1E	0.19	0.08	-0.09	0.17	0.04	-1.22
224	MFAP1	-0.6	0.19	-0.91	0.19	0.01	-1.24
225	TMOD2	0.5	0.08	0.19	0.12	0.03	-1.24
226	SH2D4A	0.34	0.11	0.04	0.08	0.04	-1.24
227	PPM2C	0.33	0.07	0.01	0.09	0.02	-1.25
228	IMPA1	0.43	0.12	0.11	0.08	0.03	-1.25
229	CASP3	0.26	0.23	-0.07	0.14	0.03	-1.25
230	GBL	-0.22	0.17	-0.54	0.19	0.04	-1.25
231	STAT3	0.03	0.14	-0.3	0.23	0.02	-1.26
232	EIF2B3	-0.33	0.05	-0.66	0.09	0.03	-1.26
233	SMUG1	0.15	0.12	-0.19	0.14	0.01	-1.27
234	RAB40B	-0.55	0.23	-0.9	0.25	0.04	-1.27
235	MR4-PT0052-208-F11	0.25	0.26	-0.09	0.19	0.05	-1.27
236	NCK1	-0.26	0.24	-0.61	0.32	0.04	-1.28
237	QV1-MT0227-511-C03	-1.24	0.68	-1.63	0.78	0.05	-1.31
238	MKRN1	-0.24	0.12	-0.65	0.05	0.02	-1.33
239	RC74	0.42	0.15	0.01	0.13	0.04	-1.33
240	EPB41L4A	0.46	0.2	0.02	0.3	0.04	-1.36
241	MR1-ST0206-016-C09	1.14	0.07	0.68	0.15	0.04	-1.38
242	PALM	0.5	0.35	0.03	0.17	0.05	-1.38
243	COMMD3	0.62	0.1	0.15	0.08	0.01	-1.39
244	GTPBP10/IL3-CT0219-022-G02	0.36	0.28	-0.11	0.24	0.02	-1.39
245	C1RL	0.73	0.14	0.26	0.05	0.03	-1.39
246	CM1-UT0041-359-E04	0.62	0.27	0.14	0.17	0.02	-1.40
247	SCRN1	1.39	0.32	0.91	0.15	0.04	-1.40
248	ZDHHC6	-0.27	0.24	-0.75	0.14	0.05	-1.40
249	CLIC1	0.25	0.3	-0.25	0.38	0.03	-1.41
250	PRKCE	0.52	0.19	0.02	0.24	0.04	-1.41
251	ANK2	0.5	0.16	2.48E-009	0.11	0.01	-1.42
252	RAC1	0.23	0.08	-0.27	0.22	0.03	-1.42
253	TMLHE	0.08	0.08	-0.44	0.14	0.00	-1.43
254	C9orf19	1.00	0.17	0.48	0.13	0.02	-1.43
255	QV3-OT0063-165-A05	0.44	0.22	-0.08	0.2	0.04	-1.44
256	DES	0.69	0.21	0.15	0.23	0.00	-1.45
257	MAGI1	0.7	0.1	0.16	0.09	0.04	-1.45
258	TTF1	-0.48	0.38	-1.02	0.31	0.01	-1.46
259	GLT8D1	1.02	0.15	0.48	0.09	0.05	-1.46
260	UBE2N	0.00	0.11	-0.56	0.19	0.01	-1.48
261	BAZ2B	0.3	0.41	-0.28	0.37	0.01	-1.49
262	QV3-DT0044-045-A10	0.63	0.19	0.05	0.27	0.01	-1.49
263	NAP1L5	1.38	0.16	0.81	0.31	0.03	-1.49
264	CM1-NN1003-184-A12	-0.3	0.24	-0.87	0.05	0.03	-1.49
265	TTYH3	0.71	0.2	0.13	0.2	0.02	-1.5

nº	Gene	FN(-) m	FN(-) SD	FN(-)/MDA m	F(-)/MDA SD	p	Fold
266	ETV5	0.13	0.14	-0.47	0.1	0.04	-1.51
267	C1orf103	1.47	0.11	0.88	0.21	0.05	-1.51
268	KIFC2	-0.34	0.36	-0.95	0.43	0.04	-1.52
269	SNAP25	0.6	0.16	-0.03	0.22	0.04	-1.55
270	STK16	0.12	0.42	-0.52	0.31	0.01	-1.56
271	TTRAP	0.43	0.52	-0.22	0.5	0.03	-1.57
272	CP110	0.25	0.27	-0.41	0.23	0.00	-1.58
273	DCUN1D5	-0.09	0.17	-0.75	0.14	0.04	-1.58
274	MAML2	0.63	0.09	-0.05	0.07	0.00	-1.59
275	BCAS2	-0.77	0.47	-1.44	0.4	0.02	-1.59
276	STYXL1	-1.24	0.24	-1.91	0.13	0.04	-1.59
277	HAT1	-0.86	0.12	-1.54	0.28	0.02	-1.60
278	PSMD14	-0.73	0.08	-1.41	0.22	0.03	-1.60
279	ALKBH3	-0.1	0.23	-0.81	0.28	0.02	-1.64
280	COPS6	0.57	0.22	-0.15	0.33	0.05	-1.64
281	SQRDL	0.14	0.03	-0.58	0.08	0.00	-1.65
282	PEL1	0.28	0.28	-0.44	0.12	0.02	-1.65
283	PHF11	1.42	0.15	0.69	0.13	0.03	-1.65
284	GGPS1	-0.2	0.46	-0.94	0.21	0.04	-1.66
285	PTGS1	1.57	0.21	0.84	0.17	0.05	-1.66
286	CM1-CI0032-607-F01	1.25	0.04	0.51	0.09	0.01	-1.67
287	HTRA1	5.76	0.14	5.03	0.12	0.01	-1.67
288	QV2-BT0271-052-H11	0.36	0.25	-0.38	0.26	0.02	-1.67
289	PCYOX1	0.37	0.24	-0.37	0.09	0.05	-1.67
290	ARHGEF9	0.23	0.3	-0.52	0.44	0.01	-1.68
291	PKIA	0.67	0.36	-0.08	0.43	0.02	-1.68
292	C15orf15	0.19	0.39	-0.56	0.14	0.04	-1.69
293	IFNGR1	-0.28	0.06	-1.03	0.32	0.04	-1.69
294	PPM1B	0.28	0.15	-0.5	0.22	0.04	-1.71
295	SYAP1	0.00	0.22	-0.77	0.11	0.05	-1.71
296	SUOX	0.23	0.13	-0.55	0.18	0.02	-1.72
297	GOLPH2	0.03	0.28	-0.76	0.18	0.04	-1.72
298	TSPAN31	0.99	0.36	0.2	0.11	0.04	-1.73
299	OCIAD1	-0.8	0.28	-1.6	0.2	0.00	-1.75
300	TMEM126B	0.13	0.26	-0.68	0.08	0.03	-1.75
301	MKRN2	1.08	0.25	0.25	0.34	0.03	-1.77
302	TEGT	0.91	0.28	0.06	0.17	0.01	-1.80
303	GPC1	-0.69	0.16	-1.53	0.08	0.01	-1.80
304	GNL3	0.33	0.12	-0.53	0.2	0.00	-1.82
305	IRS1	1.28	0.1	0.4	0.19	0.03	-1.84
306	CCDC55	0.51	0.33	-0.37	0.05	0.05	-1.84
307	EBAG9	-1.3	0.13	-2.21	0.14	0.01	-1.88
308	PLAUR	1.96	0.25	1.05	0.32	0.01	-1.88
309	CYB5R4	-1.34	0.17	-2.28	0.2	0.02	-1.91
310	PRMT2	1.09	0.13	0.15	0.33	0.02	-1.91
311	TARS	-0.36	0.56	-1.29	0.53	0.03	-1.91
312	C1orf50	0.57	0.24	-0.38	0.26	0.00	-1.93
313	NUDT5/IL0-HT0205-138-E03	0.59	0.06	-0.35	0.42	0.05	-1.93
314	ACN9	0.14	0.39	-0.81	0.25	0.02	-1.94
315	C7orf44	-0.01	0.06	-0.97	0.22	0.02	-1.95
316	DCTN3	0.27	0.3	-0.7	0.19	0.00	-1.96
317	LXN	1.22	0.19	0.25	0.36	0.01	-1.96
318	C6orf49	-0.22	0.14	-1.2	0.13	0.00	-1.97
319	SWAP70	1.32	0.23	0.35	0.2	0.00	-1.97

n°	Gene	FN(-) m	FN(-) SD	FN(-)/MDA m	F(-)/MDA SD	p	Fold
320	URG4	-0.08	0.19	-1.05	0.12	0.02	-1.97
321	QV2-NT0048-316-F09	0.01	0.17	-0.98	0.26	0.05	-1.98
322	CD82	1.99	0.74	0.99	0.57	0.02	-1.99
323	CM1-UM0031-139-H08	-0.36	0.22	-1.39	0.16	0.00	-2.04
324	MR3-HT1104-002-G11	1.36	0.09	0.34	0.33	0.02	-2.04
325	TACC1	-0.32	0.23	-1.35	0.07	0.02	-2.05
326	QV1-DT0070-339-E08	0.04	0.43	-1.00	0.57	0.01	-2.06
327	ETNK2	0.5	0.07	-0.55	0.14	0.00	-2.07
328	UBE1C	1.16	0.15	0.1	0.27	0.01	-2.08
329	CIB1	0.48	0.26	-0.59	0.21	0.00	-2.09
330	ADH5	1.47	0.26	0.4	0.24	0.02	-2.09
331	ACTR10	-0.79	0.22	-1.86	0.19	0.01	-2.11
332	RBED1	0.86	0.02	-0.21	0.26	0.02	-2.11
333	SEC11A	0.37	0.26	-0.71	0.44	0.03	-2.12
334	GSTA4	1.33	0.27	0.25	0.09	0.03	-2.12
335	PM0-HT0339-015-B12	2.02	0.37	0.93	0.11	0.03	-2.13
336	KIF21B	-0.16	0.63	-1.27	0.99	0.04	-2.15
337	MTFMT	0.29	0.25	-0.82	0.12	0.01	-2.16
338	CCDC90B	0.46	0.42	-0.67	0.24	0.02	-2.18
339	HMGCL	0.62	0.12	-0.5	0.16	0.02	-2.18
340	C1QB	0.27	0.15	-0.86	0.23	0.01	-2.19
341	PSMB9	-0.27	0.16	-1.4	0.47	0.03	-2.19
342	THUMPD3	1.16	0.25	0.02	0.11	0.01	-2.20
343	COQ9	-0.94	0.53	-2.07	0.17	0.04	-2.20
344	CHMP4A	-0.12	0.18	-1.26	0.23	0.04	-2.20
345	DUSP18	-0.82	0.38	-1.99	0.06	0.02	-2.25
346	TRA16	-0.18	0.26	-1.35	0.43	0.04	-2.25
347	PMPCB	-0.33	0.44	-1.53	0.69	0.03	-2.30
348	ATP5H	0.32	0.09	-0.9	0.31	0.03	-2.33
349	ASAH1	1.37	0.41	0.14	0.13	0.02	-2.34
350	MR3-HN0123-001-C12	1.15	0.24	-0.08	0.34	0.00	-2.35
351	WDR42A	0.29	0.35	-0.95	0.23	0.03	-2.36
352	ZCCHC17	1.25	0.12	0.01	0.45	0.04	-2.36
353	CM0-AN0007-490-C02	-0.12	0.14	-1.36	0.32	0.04	-2.36
354	HECTD3	-0.62	0.15	-1.86	0.13	0.00	-2.37
355	ADORA2B	0.03	0.49	-1.21	0.11	0.04	-2.37
356	SKP1A	0.74	0.13	-0.53	0.26	0.00	-2.41
357	MAD2L2	-0.29	0.15	-1.56	0.23	0.02	-2.41
358	SEC31A	1.81	0.32	0.51	0.48	0.02	-2.46
359	SNX5	1.52	0.22	0.21	0.12	0.02	-2.47
360	TIPIN	-0.54	0.55	-1.84	0.22	0.04	-2.47
361	RC0-TN0080-031-E01	3.23	0.33	1.91	0.19	0.01	-2.50
362	CM0-PT0049-140-D01	2.7	0.18	1.36	0.14	0.02	-2.54
363	NPR2	2.87	0.94	1.51	0.72	0.03	-2.57
364	WNT10B	2.13	0.27	0.76	0.29	0.01	-2.58
365	RC0-FN0025-021-E06	-0.4	0.23	-1.77	0.5	0.02	-2.59
366	FLOT1	-0.15	0.19	-1.52	0.45	0.05	-2.60
367	AKAP8L	1.22	0.38	-0.17	0.2	0.04	-2.62
368	BLVRA	-0.12	0.36	-1.52	0.51	0.01	-2.65
369	DARS	-0.08	0.09	-1.49	0.07	0.00	-2.66
370	RC4-BN0408-012-F06	0.5	0.32	-0.91	0.09	0.01	-2.66
371	RIT1	0.55	0.14	-0.86	0.38	0.03	-2.66
372	TSPAN8	1.13	0.52	-0.31	0.39	0.01	-2.72
373	GTF2A2	-0.06	0.33	-1.5	0.39	0.04	-2.73

nº	Gene	FN(-) m	FN(-) SD	FN(-)/MDA m	F(-)/MDA SD	p	Fold
374	RPL18	-0.77	0.14	-2.22	0.47	0.05	-2.73
375	CHPT1	0.04	0.31	-1.41	0.13	0.03	-2.74
376	ATP5L	0.87	0.17	-0.64	0.32	0.01	-2.85
377	QV0-BN0040-160-B12	1.92	0.18	0.39	0.19	0.01	-2.89
378	PGCP	2.97	0.44	1.43	0.4	0.02	-2.91
379	BLOC1S1	1.11	0.35	-0.44	0.66	0.02	-2.92
380	HAX1	-0.72	0.26	-2.27	0.41	0.04	-2.93
381	NENF	0.01	0.14	-1.55	0.46	0.04	-2.95
382	UBE2L6	1.39	0.12	-0.17	0.28	0.02	-2.96
383	PHYH	0.6	0.29	-1.00	0.49	0.05	-3.02
384	PRR8	0.82	0.32	-0.78	0.09	0.02	-3.03
385	SAT2	0.3	0.24	-1.34	0.48	0.04	-3.10
386	XRCC6BP1	-0.85	0.08	-2.5	0.55	0.04	-3.12
387	NUDT5/MR3-HT0713-004-B10	0.42	0.15	-1.23	0.31	0.02	-3.13
388	TMSB4Y	1.88	0.06	0.18	0.25	0.01	-3.26
389	RC6-ST0198-011-G01	0.35	0.07	-1.36	0.4	0.01	-3.27
390	CM0-BT0304-093-B08	2.78	0.14	1.07	0.49	0.04	-3.27
391	MRPL39	-0.58	0.16	-2.3	0.41	0.01	-3.29
392	RGS2	1.39	0.35	-0.33	0.26	0.01	-3.30
393	MGST3	1.15	0.32	-0.6	0.4	0.00	-3.36
394	LSM3	0.59	0.31	-1.16	0.69	0.05	-3.36
395	CREG1	0.97	0.29	-0.78	0.32	0.04	-3.37
396	COX5B	0.3	0.42	-1.47	0.18	0.03	-3.41
397	EIF3S3	-0.72	0.19	-2.59	0.74	0.05	-3.66
398	MRPS21	0.58	0.25	-1.3	0.4	0.02	-3.68
399	PSMA5	-0.1	0.17	-1.99	0.37	0.02	-3.70
400	TSC22D3	0.89	0.33	-1.01	0.64	0.01	-3.73
401	JOSD3	0.98	0.4	-0.92	0.22	0.02	-3.73
402	NOLA3	1.32	0.38	-0.58	0.35	0.04	-3.75
403	CHD8	0.91	0.41	-1.00	0.24	0.00	-3.76
404	C6orf170	0.71	0.07	-1.2	0.08	0.00	-3.76
405	FLJ11151	1.75	0.44	-0.19	0.08	0.02	-3.84
406	ATP5J2	0.27	0.44	-1.68	0.34	0.02	-3.87
407	TPM2	1.65	0.18	-0.34	0.45	0.03	-3.95
408	C17orf37	0.2	0.38	-1.89	0.91	0.04	-4.26
409	PCTK3	2.75	0.55	0.66	0.17	0.02	-4.28
410	GPM6B	3.34	1.00	1.19	0.52	0.04	-4.45
411	HDPY-30	0.64	0.18	-1.56	0.71	0.05	-4.57
412	MRPL22	0.37	0.53	-2.02	1.00	0.04	-5.22
413	UXT	1.05	0.43	-1.45	0.18	0.01	-5.67
414	HRAS	4.74	0.96	2.08	1.51	0.02	-6.32
415	B2M	3.04	1.18	0.3	0.68	0.01	-6.71

Tabela 14 - Genes diferencialmente expressos analisados por teste T em fibroblasto de linfonodo comprometido [FN(+)] e fibroblasto de linfonodo comprometido co-cultivado com célula epitelial MDA-MB231 [FN(+)/MDA], quando analisados sua expressão em lâmina de microarray, fold=variação de expressão, p=significância, m=média e SD=desvio padrão

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
1	COTL1	0.57	0.64	3.3	0.12	0.02	6.67
2	LIMK1	0.24	0.21	2.25	0.55	0.01	4.05
3	SLC39A7	0.53	0.38	2.47	0.12	0.02	3.83
4	SLC12A4	0.97	0.48	2.85	0.54	0.04	3.67

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
5	MGC2752	-1.02	0.44	0.83	0.33	0.00	3.61
6	MR0-AN0082-002-E10	-0.71	0.34	1.14	0.04	0.01	3.60
7	MVP	1.3	0.84	3.14	0.38	0.02	3.59
8	FADS2	1.04	0.33	2.87	0.34	0.04	3.56
9	ACLY	-0.28	0.12	1.5	0.56	0.04	3.44
10	MAP2K3	-0.21	0.33	1.56	0.26	0.00	3.40
11	FBXW5	-0.49	0.14	1.23	0.15	0.00	3.28
12	ITGB1	1.17	0.9	2.88	0.54	0.02	3.26
13	MBD3	-0.64	0.05	1.03	0.13	0.00	3.18
14	GBF1	-0.12	0.23	1.55	0.34	0.01	3.18
15	AXUD1	0.09	0.26	1.73	0.54	0.03	3.12
16	SF1	-0.4	0.17	1.21	0.33	0.03	3.06
17	DIAPH1	-1.61	0.31	-0.02	0.12	0.01	3.00
18	IL1B	0.18	0.26	1.76	0.4	0.04	3.00
19	PM0-CT0263-005-E08	-1.85	0.24	-0.27	0.36	0.04	2.98
20	ACTN4	-0.99	0.64	0.58	0.44	0.01	2.96
21	FAM134C	-0.58	0.3	0.97	0.14	0.01	2.93
22	COPE	-0.93	0.44	0.6	0.2	0.01	2.87
23	RC0-FN0025-031-B01	-1.46	0.34	0.04	0.28	0.00	2.83
24	BLCAP	-1.36	0.35	0.13	0.12	0.01	2.81
25	TSPAN17	-1.2	0.06	0.28	0.26	0.01	2.79
26	SPNS1	-0.68	0.08	0.78	0.09	0.00	2.74
27	SERINC2	0.01	0.12	1.46	0.21	0.01	2.74
28	QV3-HT1017-481-E02	0.59	0.15	2.04	0.38	0.01	2.73
29	MAP1LC3B	-0.29	0.24	1.1	0.09	0.01	2.63
30	SHC1	-0.89	0.35	0.5	0.16	0.02	2.63
31	RNF40	-0.9	0.14	0.49	0.08	0.01	2.62
32	ADIPOR2	-1.06	0.09	0.3	0.39	0.02	2.58
33	INPPL1	-0.09	0.57	1.28	0.1	0.04	2.58
34	MR2-GN0126-008-G08	-0.8	0.15	0.56	0.16	0.01	2.56
35	SAE1	-1.93	0.13	-0.57	0.33	0.03	2.56
36	CPZ	0.77	0.22	2.13	0.4	0.04	2.56
37	QV0-BT0263-132-H07	-0.36	0.02	0.99	0.11	0.00	2.54
38	PM2-ST0303-002-E07	0.63	1.03	1.95	1.25	0.01	2.50
39	INADL	-1.98	0.15	-0.66	0.27	0.02	2.49
40	MGC16824	0.43	0.36	1.74	0.1	0.03	2.48
41	M-RIP	-0.43	0.44	0.88	0.08	0.04	2.47
42	DNAH1	-0.13	0.25	1.15	0.28	0.04	2.44
43	CBR3	-0.72	0.85	0.57	0.59	0.04	2.44
44	MR1-HT1184-001-C10	1.99	0.28	3.27	0.58	0.02	2.43
45	SPINK7	-2.23	0.27	-0.95	0.07	0.02	2.43
46	CXXC1	-0.96	0.13	0.31	0.2	0.00	2.42
47	CLIP2	0.58	0.03	1.85	0.39	0.03	2.41
48	PM0-ET0274-001-A03	-0.65	0.51	0.62	0.2	0.04	2.41
49	KIAA0310	0.35	0.5	1.61	0.26	0.04	2.40
50	PM3-FN0213-001-A04	-0.1	0.26	1.15	0.27	0.00	2.38
51	RAD23A	-0.1	0.14	1.14	0.31	0.03	2.37
52	C16orf5	-0.5	0.42	0.73	0.43	0.00	2.35
53	LTBP3	0.01	0.31	1.23	0.54	0.04	2.33
54	VPS24	-0.45	0.37	0.75	0.21	0.02	2.30
55	PM0-GN0210-003-G10	-0.68	0.13	0.52	0.19	0.02	2.30
56	AMD1	-0.26	0.18	0.93	0.03	0.01	2.29
57	C22orf5	0.65	0.12	1.84	0.05	0.01	2.29
58	FNDC4	-0.64	0.23	0.54	0.08	0.01	2.27

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
59	C6orf85	1.49	0.35	2.65	0.41	0.01	2.24
60	SLC4A2	0.00	0.12	1.16	0.35	0.03	2.24
61	GAS2L1	0.28	0.24	1.42	0.13	0.00	2.21
62	NMT1	-0.99	0.25	0.16	0.34	0.03	2.21
63	FAIM2	0.16	0.3	1.3	0.28	0.00	2.20
64	MAP3K12	0.31	0.26	1.45	0.13	0.04	2.20
65	PLXNB2	0.1	0.24	1.23	0.21	0.02	2.19
66	AKT1S1	-0.99	0.18	0.14	0.25	0.04	2.18
67	TTLL12	-0.47	0.27	0.65	0.12	0.04	2.17
68	MLLT1	0.11	0.26	1.22	0.26	0.00	2.16
69	RC0-HT0934-031-E09	-1.41	0.11	-0.3	0.35	0.02	2.16
70	RC2-MT0148-110-H06	0.05	0.17	1.16	0.34	0.01	2.15
71	TOM1	-0.11	0.05	1.00	0.35	0.02	2.15
72	ATF7	-0.68	0.73	0.41	0.46	0.02	2.14
73	JPH4	-0.13	0.1	0.96	0.09	0.01	2.13
74	CM0-TN0034-493-G10	0.26	0.25	1.35	0.42	0.03	2.13
75	LMO7	-0.35	0.16	0.73	0.2	0.02	2.12
76	CM1-NT0271-633-D08	0.95	0.25	2.02	0.15	0.00	2.11
77	MR3-SN0066-004-G07	0.28	0.06	1.36	0.35	0.04	2.11
78	OPTN	0.8	0.37	1.87	0.28	0.03	2.10
79	GCS1	0.01	0.23	1.06	0.16	0.00	2.08
80	MR4-NT0141-213-A11	-1.07	0.24	-0.01	0.11	0.02	2.08
81	GCAT	-0.83	0.26	0.22	0.4	0.02	2.07
82	FOXN3	0.2	0.03	1.24	0.36	0.04	2.06
83	KIDINS220	-0.22	0.26	0.81	0.39	0.03	2.04
84	PTP4A1	0.32	0.26	1.35	0.06	0.03	2.04
85	PIK3R3	-1.27	0.15	-0.24	0.31	0.03	2.04
86	WDR13	-0.55	0.19	0.47	0.07	0.00	2.03
87	NEK9	-0.76	0.42	0.26	0.11	0.03	2.03
88	ASNSD1	-2.98	0.16	-1.96	0.14	0.00	2.02
89	RC0-ST0280-031-D02	2.34	0.94	3.36	1.04	0.01	2.02
90	AREG	-0.1	0.93	0.91	0.8	0.02	2.02
91	POLR2A	-0.06	0.13	0.95	0.31	0.03	2.02
92	TMEM131	-9.93E-009	0.48	1.00	0.56	0.00	2.00
93	PLCG2	-1.07	0.43	-0.07	0.42	0.00	2.00
94	SNRP70	-1.99	0.29	-0.99	0.21	0.02	2.00
95	TMEM8	-0.26	0.14	0.74	0.43	0.03	2.00
96	CM0-BN0105-292-H04	1.9	0.16	2.89	0.12	0.02	1.99
97	WWP2	-0.8	0.13	0.19	0.19	0.01	1.98
98	DCXR	-2.64	0.32	-1.65	0.1	0.02	1.98
99	ACOX3	-0.14	0.17	0.84	0.15	0.02	1.98
100	ZSWIM3	-1.6	0.08	-0.61	0.2	0.02	1.98
101	NCAPD2	-1.33	0.08	-0.36	0.17	0.02	1.97
102	GATAD2A	-0.39	0.16	0.57	0.08	0.01	1.95
103	SLC20A1	0.00	0.13	0.96	0.13	0.02	1.95
104	EFS	0.77	0.44	1.73	0.26	0.01	1.94
105	MYO1C	0.05	0.01	1.00	0.28	0.03	1.94
106	SH3TC1	-1.7	0.64	-0.75	0.49	0.01	1.93
107	LRP3	-0.35	0.1	0.6	0.1	0.01	1.93
108	TMPRSS2	-1.41	0.48	-0.47	0.43	0.00	1.92
109	SUPT6H	-0.28	0.17	0.66	0.23	0.03	1.92
110	GMIP	-0.12	0.1	0.82	0.19	0.00	1.91
111	HIATL1	-0.94	0.13	-0.02	0.2	0.01	1.90
112	JMJD2A	-0.52	0.02	0.41	0.13	0.01	1.90

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
113	STAT6	1.72	0.44	2.64	0.3	0.01	1.90
114	QV2-OT0062-091-A08	0.07	0.08	0.99	0.06	0.00	1.89
115	TAOK3	-0.69	0.17	0.22	0.11	0.01	1.88
116	PISD	0.03	0.08	0.94	0.18	0.03	1.88
117	SRCAP	-0.09	0.12	0.81	0.07	0.01	1.87
118	ATP6V0A1	-0.29	0.04	0.62	0.22	0.02	1.87
119	MRPS6	-1.59	0.27	-0.69	0.22	0.02	1.87
120	CCDC92	0.71	0.17	1.61	0.28	0.02	1.87
121	RPA2	-1.41	0.06	-0.5	0.22	0.02	1.87
122	SCO2	-0.37	0.27	0.52	0.31	0.01	1.86
123	SLC7A5	-3.34	0.42	-2.45	0.53	0.01	1.85
124	RANBP2	-1.29	0.12	-0.4	0.26	0.01	1.85
125	RGS14	-0.77	0.06	0.12	0.24	0.01	1.84
126	PLK3	0.51	0.12	1.39	0.05	0.01	1.84
127	CCM2	-0.19	0.18	0.67	0.04	0.01	1.82
128	LOC284620	-0.32	0.08	0.54	0.18	0.02	1.82
129	CAD	-0.28	0.03	0.58	0.23	0.03	1.82
130	ST6GAL1	-0.47	0.14	0.4	0.16	0.04	1.82
131	ABHD3	-2.44	0.2	-1.58	0.09	0.01	1.81
132	PM3-GN0375-005-B11	0.57	0.09	1.42	0.19	0.02	1.81
133	ITFG3	0.11	0.12	0.96	0.31	0.02	1.81
134	APC	-0.38	0.18	0.47	0.2	0.02	1.81
135	MR4-TN0114-102-G12	0.12	0.09	0.96	0.33	0.03	1.80
136	SFRS15	-0.5	0.1	0.35	0.19	0.04	1.80
137	CAMTA2	0.52	0.32	1.36	0.55	0.02	1.79
138	SMARCD3	-0.44	0.12	0.4	0.21	0.02	1.79
139	NBR1	-0.29	0.3	0.54	0.15	0.03	1.79
140	ZNF76	-0.61	0.07	0.23	0.19	0.03	1.79
141	CYP26B1	0.23	0.04	1.06	0.16	0.02	1.78
142	PSMD3	-1.19	0.24	-0.36	0.29	0.03	1.78
143	ZCCHC14	-0.21	0.11	0.62	0.21	0.03	1.78
144	BAT5	-1.18	0.16	-0.35	0.1	0.01	1.77
145	KLHL21	1.95	0.51	2.76	0.36	0.02	1.76
146	NBN	-0.21	0.13	0.61	0.07	0.02	1.76
147	ZNF289	-0.43	0.17	0.39	0.19	0.04	1.76
148	CM1-LT0042-112-D08	0.14	0.14	0.94	0.17	0.00	1.75
149	MR4-BT0358-010-H10	-2.14	0.13	-1.33	0.07	0.01	1.75
150	WDR90	-1.19	0.07	-0.38	0.11	0.02	1.75
151	NDFIP1	-0.51	0.25	0.29	0.4	0.03	1.75
152	GDI1	-0.18	0.02	0.62	0.28	0.04	1.74
153	POR	-0.08	0.23	0.71	0.09	0.01	1.73
154	NPEPL1	-0.45	0.16	0.34	0.24	0.02	1.73
155	MR2-NT0138-005-C07	-0.76	0.77	0.03	0.49	0.04	1.73
156	QV0-NN1021-345-G09	-0.35	0.34	0.43	0.24	0.01	1.72
157	SMG7	-0.52	0.27	0.26	0.05	0.03	1.72
158	B4GALT2	-0.27	0.16	0.5	0.19	0.01	1.71
159	TRPM4	-1.02	0.05	-0.25	0.22	0.02	1.71
160	GLG1	0.11	0.06	0.89	0.23	0.02	1.71
161	CM1-UT0041-359-C06	-0.66	0.08	0.1	0.13	0.00	1.70
162	MAPK13	-0.87	0.17	-0.1	0.1	0.00	1.70
163	ATF6	-1.18	0.15	-0.42	0.04	0.01	1.70
164	NAT10	-0.53	0.21	0.23	0.23	0.01	1.70
165	QV3-OT0064-230-D10	0.7	0.56	1.46	0.71	0.02	1.70
166	GNG12	0.17	0.11	0.94	0.35	0.03	1.70

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
167	PM0-HT0425-001-D07	1.33	0.43	2.09	0.4	0.02	1.69
168	BIRC6	0.19	0.1	0.94	0.2	0.03	1.69
169	ILVBL	-0.24	0.15	0.51	0.25	0.01	1.68
170	DNPEP	-0.7	0.11	0.05	0.04	0.01	1.68
171	SERPINB6	-0.74	0.09	0.01	0.17	0.01	1.68
172	CTA-221G9.4	-2.86	0.17	-2.12	0.19	0.01	1.67
173	CSNK1G2	0.7	0.11	1.44	0.31	0.03	1.67
174	CM1-FT0052-267-C04	-1.33	0.29	-0.59	0.1	0.04	1.67
175	YIPF5	-0.13	0.15	0.6	0.08	0.01	1.66
176	IL4R	-0.11	0.28	0.61	0.15	0.01	1.65
177	IQWD1	-6.21E-010	0.16	0.73	0.26	0.03	1.65
178	SYN1	0.18	0.31	0.91	0.11	0.03	1.65
179	PLOD1	1.25	0.2	1.96	0.07	0.01	1.64
180	KLK8	-1.58	0.23	-0.87	0.45	0.04	1.64
181	HNMT	0.01	0.12	0.72	0.18	0.05	1.64
182	MFN2	-0.3	0.04	0.4	0.06	0.01	1.63
183	RC0-FT0077-022-G11	-0.47	0.13	0.23	0.11	0.01	1.63
184	TTC15	0.41	0.01	1.11	0.24	0.04	1.63
185	TMEM112B	0.09	0.16	0.78	0.19	0.00	1.62
186	FDPS	-0.32	0.1	0.38	0.16	0.00	1.62
187	PPP1R13B	-0.99	0.42	-0.29	0.52	0.01	1.62
188	CDKN2C	0.29	0.09	0.99	0.02	0.01	1.62
189	PTGES2	-0.74	0.24	-0.06	0.18	0.00	1.61
190	MBD5	-1.02	0.14	-0.33	0.14	0.03	1.61
191	B4GALT3	-0.34	0.07	0.34	0.2	0.03	1.61
192	CM1-CT0605-632-B11	0.18	0.25	0.87	0.21	0.03	1.61
193	C4orf8	0.38	0.11	1.07	0.3	0.04	1.61
194	AHCYL1	-0.34	0.07	0.35	0.32	0.05	1.61
195	LRP10	1.3	0.22	1.98	0.14	0.01	1.60
196	ORC4L	-0.88	0.06	-0.2	0.05	0.01	1.60
197	EMG1	-1.36	0.13	-0.69	0.12	0.02	1.60
198	POMGNT1	-0.78	0.12	-0.1	0.19	0.04	1.60
199	LIFR	-1.64	0.34	-0.97	0.29	0.03	1.59
200	GMDS	-0.73	0.03	-0.07	0.11	0.01	1.58
201	CYP27B1	-0.61	0.26	0.06	0.14	0.01	1.58
202	POLS	-0.41	0.05	0.25	0.12	0.01	1.58
203	SGTA	-0.33	0.17	0.34	0.1	0.03	1.58
204	S100A6	-0.01	0.36	0.64	0.31	0.00	1.57
205	RIF1	-1.18	0.11	-0.53	0.09	0.00	1.57
206	PRC1	-1.77	0.33	-1.12	0.21	0.01	1.57
207	CNTROB	0.13	0.16	0.78	0.06	0.02	1.57
208	MOAP1	-0.24	0.12	0.41	0.2	0.04	1.57
209	MR4-HB0044-001-F07	0.34	0.06	0.98	0.09	0.01	1.56
210	STOML2	-1.24	0.18	-0.59	0.2	0.03	1.56
211	GAD1	-0.95	0.24	-0.31	0.15	0.04	1.56
212	EXTL3	0.62	0.27	1.25	0.28	0.04	1.55
213	PCMTD1	-0.46	0.14	0.16	0.1	0.00	1.54
214	ABLIM2	-0.31	0.16	0.31	0.05	0.02	1.54
215	BCAR1	0.02	0.09	0.64	0.09	0.02	1.54
216	SMTN	0.56	0.02	1.18	0.21	0.03	1.54
217	NCSTN	0.46	0.01	1.08	0.18	0.03	1.54
218	MCCC1	-1.6	0.17	-0.97	0.19	0.04	1.54
219	DICER1	-0.28	0.12	0.33	0.14	0.01	1.53
220	WDR48	0.38	0.34	1.00	0.57	0.04	1.53

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
221	LBR	-1.98	0.14	-1.37	0.18	0.01	1.52
222	POLR3H	-0.05	0.07	0.55	0.16	0.01	1.52
223	SNX12	-0.41	0.08	0.2	0.17	0.02	1.52
224	LTB4R2	-0.13	0.03	0.47	0.2	0.03	1.52
225	PPRC1	0.08	0.24	0.68	0.37	0.03	1.52
226	PPIL1	-2.11	0.19	-1.51	0.12	0.00	1.51
227	SMOC2	-0.61	0.56	-0.01	0.69	0.02	1.51
228	HIPK3	0.21	0.14	0.8	0.33	0.03	1.51
229	SAP130	-0.01	0.12	0.58	0.34	0.05	1.51
230	PEPD	-0.35	0.04	0.24	0.23	0.05	1.51
231	MCM4	-1.66	0.04	-1.08	0.07	0.00	1.50
232	MR4-TN0115-201-C11	-0.14	0.18	0.44	0.32	0.05	1.50
233	PLCB2	-0.46	0.14	0.12	0.09	0.01	1.49
234	CCT4	-1.23	0.19	-0.66	0.06	0.02	1.49
235	PIK3CB	-0.9	0.21	-0.34	0.29	0.01	1.48
236	SOAT1	-0.04	0.11	0.53	0.12	0.03	1.48
237	SUDS3	-0.09	0.2	0.47	0.05	0.03	1.48
238	PTPN12	0.15	0.33	0.72	0.32	0.03	1.48
239	XPO5	-1.19	0.32	-0.62	0.36	0.04	1.48
240	MRPS27	-0.45	0.3	0.1	0.34	0.00	1.47
241	TAF1C	-0.49	0.18	0.07	0.09	0.01	1.47
242	LARGE	0.41	0.22	0.97	0.13	0.02	1.47
243	KIAA0143	0.53	0.26	1.09	0.32	0.02	1.47
244	AES	-0.1	0.2	0.46	0.21	0.03	1.47
245	LIMK2	-1.78	0.26	-1.22	0.12	0.03	1.47
246	C17orf68	-0.43	0.08	0.12	0.08	0.03	1.47
247	SFRS6	-0.84	0.31	-0.28	0.19	0.04	1.47
248	CTSA	0.04	0.05	0.6	0.17	0.04	1.47
249	IGF1R	0.87	0.36	1.42	0.41	0.02	1.46
250	BTBD6	0.41	0.18	0.96	0.13	0.02	1.46
251	MZF1	-0.53	0.16	0.01	0.36	0.05	1.46
252	IPO13	-0.23	0.13	0.31	0.09	0.03	1.45
253	GFM1	-0.96	0.12	-0.43	0.31	0.04	1.45
254	C17orf85	-0.73	0.17	-0.2	0.15	0.04	1.45
255	POP7	-2.06	0.03	-1.53	0.13	0.01	1.44
256	C17orf62	-0.34	0.09	0.17	0.07	0.02	1.43
257	ALG9	-0.17	0.25	0.35	0.2	0.02	1.43
258	DDX23	-0.87	0.18	-0.35	0.24	0.02	1.43
259	SLC46A3	0.51	0.08	1.03	0.12	0.03	1.43
260	SLC27A3	-0.04	0.05	0.47	0.1	0.01	1.42
261	MBD1	-0.8	0.15	-0.3	0.04	0.02	1.42
262	C17orf45	0.49	0.15	0.99	0.12	0.02	1.42
263	CMYA5	0.32	0.1	0.83	0.07	0.02	1.42
264	DIP2C	-0.02	0.08	0.49	0.19	0.04	1.42
265	UNQ1887	-0.56	0.14	-0.06	0.17	0.00	1.41
266	ACSL5	-0.01	0.11	0.48	0.2	0.02	1.41
267	MIR16	-1.06	0.2	-0.57	0.07	0.03	1.41
268	CAMKK2	-0.12	0.13	0.37	0.14	0.01	1.40
269	CM0-NT0133-614-A09	-0.36	0.4	0.13	0.32	0.01	1.40
270	BRPF1	0.02	0.15	0.51	0.07	0.02	1.40
271	SUPT4H1	-0.51	0.07	-0.03	0.12	0.01	1.39
272	QTRT1	-0.33	0.18	0.14	0.1	0.03	1.39
273	CDCA8	-3.26	0.17	-2.79	0.18	0.04	1.39
274	CAPN1	-0.28	0.1	0.19	0.09	0.05	1.39

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
275	PLD2	-0.31	0.08	0.15	0.09	0.00	1.38
276	CLUAP1	0.54	0.08	1.00	0.15	0.01	1.38
277	AGPAT4	1.18	0.46	1.64	0.41	0.01	1.38
278	SPG3A	-1.08	0.2	-0.62	0.31	0.02	1.38
279	LOC90835	0.01	0.12	0.47	0.05	0.03	1.38
280	WFS1	0.16	0.25	0.63	0.26	0.04	1.38
281	LMO2	-0.57	0.15	-0.12	0.21	0.01	1.37
282	TXNRD1	-0.59	0.26	-0.13	0.16	0.04	1.37
283	C11orf24	0.42	0.17	0.86	0.08	0.03	1.36
284	TXN2	-0.16	0.16	0.28	0.08	0.05	1.36
285	FNBP1	0.15	0.35	0.58	0.2	0.04	1.34
286	STRN3	0.28	0.05	0.7	0.11	0.04	1.34
287	TST	-0.91	0.26	-0.49	0.3	0.00	1.33
288	RC4-HT0785-014-A12	-0.56	0.13	-0.15	0.02	0.03	1.33
289	PCBP1	0.01	0.2	0.41	0.27	0.02	1.32
290	MRPS2	-0.18	0.05	0.23	0.09	0.03	1.32
291	C9orf78	-0.85	0.34	-0.46	0.37	0.00	1.31
292	MR2-NT0137-005-C10	-0.84	0.3	-0.45	0.29	0.00	1.31
293	ATM	0.06	0.2	0.45	0.25	0.01	1.31
294	CM1-HT0878-453-C05	0.18	0.17	0.57	0.1	0.05	1.31
295	BCAR3	-1.43	0.21	-1.05	0.17	0.00	1.30
296	LAS1L	-0.69	0.18	-0.31	0.18	0.00	1.30
297	ITGB5	1.58	0.23	1.97	0.22	0.01	1.30
298	DCHS1	0.07	0.06	0.44	0.1	0.01	1.30
299	CPNE1	-0.44	0.19	-0.05	0.14	0.02	1.30
300	BIN1	-0.19	0.23	0.19	0.3	0.03	1.30
301	PIAS3	0.44	0.12	0.82	0.08	0.03	1.30
302	CTDP1	-0.01	0.06	0.35	0.12	0.02	1.29
303	LARS	-0.08	0.12	0.29	0.21	0.02	1.29
304	TPD52L2	-0.69	0.12	-0.32	0.02	0.02	1.29
305	ZNF200	-1.12	0.13	-0.76	0.21	0.02	1.28
306	GPBP1	-0.52	0.18	-0.16	0.16	0.04	1.28
307	RRAD	-0.75	0.26	-0.4	0.29	0.04	1.28
308	PM3-GN0516-008-F09	-0.01	0.06	0.34	0.14	0.04	1.28
309	MR4-NN0205-101-C02	0.32	0.06	0.67	0.12	0.04	1.28
310	RNF157	0.00	0.22	0.34	0.22	0.01	1.27
311	QV0-DT0047-123-B07	-0.02	0.1	0.32	0.19	0.04	1.27
312	LOC51136	-0.64	0.23	-0.29	0.11	0.04	1.27
313	LOC138948	-0.03	0.15	0.31	0.16	0.00	1.26
314	ASCC2	-0.47	0.14	-0.14	0.19	0.03	1.26
315	NDUFA8	-0.15	0.1	0.18	0.03	0.03	1.26
316	PM0-HT1311-001-G11	-1.15	0.31	-0.82	0.19	0.04	1.26
317	PLXNA2	-0.13	0.11	0.2	0.11	0.04	1.26
318	OPA1	-0.58	0.15	-0.26	0.19	0.01	1.25
319	TRRAP	-0.2	0.02	0.11	0.07	0.01	1.25
320	GTF2H4	-0.56	0.26	-0.23	0.26	0.02	1.25
321	RC2-HT0252-014-D04	-0.12	0.06	0.2	0.06	0.03	1.25
322	GABBR2	0.18	0.19	0.51	0.07	0.05	1.25
323	CLP1	-0.27	0.16	0.04	0.07	0.05	1.24
324	TUBE1	0.01	0.17	0.31	0.15	0.02	1.23
325	KIAA0664	-0.51	0.1	-0.21	0.2	0.04	1.23
326	TCF25	0.68	0.15	0.98	0.04	0.04	1.23
327	RASSF4	-0.09	0.07	0.2	0.11	0.01	1.22
328	C19orf6	-0.17	0.11	0.12	0.19	0.02	1.22

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
329	CM2-HT0244-029-E04	-0.05	0.03	0.24	0.09	0.02	1.22
330	ZNF266	-0.93	0.23	-0.64	0.22	0.05	1.22
331	ZNF294	-0.15	0.11	0.12	0.06	0.01	1.21
332	MDM2	0.45	0.23	0.72	0.21	0.03	1.21
333	CD14	0.24	0.24	0.52	0.18	0.04	1.21
334	FBXL18	-0.1	0.07	0.17	0.08	0.04	1.21
335	TOR1AIP1	-0.98	0.19	-0.72	0.2	0.02	1.20
336	CLIP1	0.03	0.05	0.29	0.11	0.02	1.20
337	OSBPL3	-0.11	0.07	0.15	0.13	0.02	1.20
338	PLP2	-0.77	0.33	-0.51	0.31	0.02	1.20
339	KIAA1949	1.87	0.17	2.14	0.25	0.03	1.20
340	MR0-HT0559-028-A01	-0.72	0.15	-0.46	0.05	0.05	1.20
341	PM0-HN0073-002-B02	0.13	0.12	0.38	0.1	0.03	1.19
342	MGEA5	0.5	0.09	0.74	0.11	0.00	1.18
343	DEF6	-0.85	0.11	-0.61	0.11	0.01	1.18
344	NDRG1	-0.06	0.17	0.18	0.12	0.03	1.18
345	SMARCA1	0.29	0.17	0.53	0.1	0.03	1.18
346	CM1-BN0116-189-G11	2.31	0.99	2.55	0.9	0.04	1.18
347	KIRREL	0.11	0.12	0.35	0.06	0.04	1.18
348	ZNF2	-0.37	0.18	-0.13	0.1	0.04	1.18
349	NMT2	-0.11	0.02	0.13	0.11	0.05	1.18
350	MAP2K1	-1.14	0.14	-0.91	0.15	0.00	1.17
351	TFDP1	-1.36	0.06	-1.14	0.1	0.01	1.17
352	MR2-HT1160-010-C06	0.14	0.25	0.37	0.19	0.02	1.17
353	TOM1L2	0.04	0.08	0.26	0.15	0.05	1.17
354	GNAO1	-0.15	0.07	0.07	0.11	0.01	1.16
355	ITSN2	-0.52	0.16	-0.3	0.22	0.02	1.16
356	ZNF484	-0.57	0.11	-0.35	0.19	0.04	1.16
357	SEC24C	-0.13	0.09	0.09	0.16	0.04	1.16
358	IREB2	-0.22	0.13	-0.01	0.2	0.04	1.16
359	LOC158402	0.1	0.14	0.32	0.07	0.04	1.16
360	PDE4DIP	-0.1	0.09	0.1	0.1	0.02	1.15
361	CHMP5	-1.02	0.11	-0.81	0.16	0.03	1.15
362	LOC285628	0.08	0.07	0.28	0.04	0.02	1.14
363	RC4-NT0117-015-A10	-0.04	0.02	0.15	0.06	0.02	1.14
364	PHYHIP	0.17	0.17	0.35	0.22	0.03	1.14
365	ITSN1	0.77	0.51	0.96	0.51	0.03	1.14
366	QV3-BN0047-284-D03	-0.42	0.03	-0.24	0.04	0.01	1.13
367	PM3-ET0207-008-H07	-0.2	0.06	-0.02	0.08	0.02	1.13
368	STARD9	0.06	0.19	0.23	0.19	0.02	1.13
369	B3GNT3	-0.3	0.16	-0.14	0.12	0.02	1.12
370	CDK6	-0.07	0.04	0.1	0.04	0.02	1.12
371	C10orf58	-0.68	0.24	-0.53	0.23	0.00	1.11
372	RC2-MT0148-019-D02	0.02	0.15	0.16	0.12	0.02	1.11
373	CRTAC1	0.15	0.09	0.29	0.13	0.02	1.11
374	IL3-CT0219-034-B02	0.17	0.15	0.3	0.16	0.00	1.10
375	PM0-AN0087-012-A05	0.03	0.03	0.16	0.03	0.00	1.10
376	BSDC1	-0.07	0.16	0.07	0.16	0.00	1.10
377	XAB2	-0.23	0.13	-0.09	0.1	0.02	1.10
378	RC2-ST0164-011-B03	0.05	0.05	0.18	0.04	0.05	1.09
379	MR2-HT1163-010-B03	-0.14	0.1	-0.02	0.1	0.01	1.08
380	P2RX1	0.02	0.1	0.13	0.08	0.04	1.08
381	C1orf91	0.03	0.2	0.12	0.19	0.05	1.06
382	MSL-1	0.23	0.1	0.3	0.1	0.01	1.05

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
383	FBN2	0.09	0.06	0.16	0.05	0.01	1.05
384	EDG1	-0.75	0.16	-0.8	0.18	0.03	-1.03
385	NME6	0.04	0.05	-0.01	0.04	0.03	-1.04
386	STK4	-0.14	0.08	-0.21	0.1	0.02	-1.05
387	HECW2	0.17	0.13	0.11	0.12	0.02	-1.05
388	PIP5K1C	0.25	0.13	0.18	0.13	0.04	-1.05
389	MMP13	0.07	0.08	-0.03	0.07	0.00	-1.07
390	SEC14L1	0.02	0.06	-0.07	0.09	0.03	-1.07
391	NCK1	0.00	0.27	-0.12	0.26	0.01	-1.09
392	FAM20A	0.24	0.09	0.12	0.08	0.03	-1.09
393	SR-A1	0.21	0.12	0.08	0.16	0.00	-1.10
394	ZFYVE16	0.29	0.2	0.15	0.21	0.03	-1.10
395	HMP19	0.28	0.04	0.14	0.09	0.04	-1.10
396	ZNF689	-0.04	0.03	-0.19	0.02	0.02	-1.11
397	CLK1	0.12	0.46	-0.03	0.47	0.04	-1.11
398	SMUG1	0.02	0.06	-0.14	0.05	0.01	-1.12
399	TIMM50	0.09	0.07	-0.08	0.12	0.05	-1.13
400	MR4-BT0358-014-B11	0.07	0.08	-0.12	0.05	0.01	-1.14
401	C10orf119	-0.28	0.04	-0.47	0.03	0.02	-1.14
402	DFFA	-0.59	0.13	-0.78	0.17	0.03	-1.14
403	GPRC5B	0.05	0.18	-0.14	0.22	0.03	-1.14
404	ZNF627	0.13	0.09	-0.07	0.13	0.02	-1.15
405	GBP4	0.13	0.17	-0.07	0.24	0.03	-1.15
406	NEB	0.15	0.13	-0.05	0.18	0.03	-1.15
407	PRKAG1	0.14	0.12	-0.06	0.15	0.03	-1.15
408	HOXA10	0.33	0.13	0.12	0.09	0.03	-1.15
409	DNM1	0.13	0.07	-0.07	0.04	0.04	-1.15
410	C1GALT1C1	0.86	0.29	0.65	0.27	0.00	-1.16
411	AMIGO1	-0.39	0.15	-0.61	0.16	0.00	-1.16
412	SH2D4A	0.34	0.12	0.13	0.12	0.00	-1.16
413	GFAP	0.6	0.12	0.39	0.19	0.04	-1.16
414	MBNL3	-0.65	0.17	-0.87	0.1	0.04	-1.16
415	LRRFIP2	0.25	0.34	0.03	0.42	0.05	-1.16
416	KRT80	-0.08	0.07	-0.31	0.1	0.01	-1.17
417	BOP1	-0.12	0.11	-0.34	0.06	0.02	-1.17
418	ZNF384	0.17	0.06	-0.06	0.1	0.02	-1.17
419	TAF4	-0.23	0.07	-0.46	0.11	0.03	-1.17
420	TAS2R14	0.26	0.23	0.02	0.23	0.01	-1.18
421	RAB11A	-0.04	0.05	-0.28	0.08	0.02	-1.18
422	PTPRU	0.06	0.17	-0.18	0.09	0.03	-1.18
423	GCNT1	0.31	0.23	0.06	0.16	0.03	-1.18
424	MLX	-0.24	0.08	-0.47	0.03	0.03	-1.18
425	USP38	0.75	0.23	0.51	0.17	0.03	-1.18
426	QV2-MT0131-460-G10	-0.32	0.33	-0.56	0.36	0.04	-1.18
427	PM2-AN0089-011-F12	-0.04	0.07	-0.29	0.1	0.01	-1.19
428	RNF141	2.59	0.41	2.34	0.41	0.01	-1.19
429	KIAA0082	-0.12	0.17	-0.37	0.11	0.03	-1.19
430	ITGAM	0.17	0.18	-0.08	0.08	0.05	-1.19
431	PEX3	-1.5	0.1	-1.76	0.08	0.01	-1.20
432	RC0-MT0056-021-F09	0.41	0.07	0.15	0.05	0.04	-1.20
433	SCFD1	-0.62	0.13	-0.89	0.04	0.04	-1.20
434	NUDT21	0.31	0.06	0.05	0.03	0.04	-1.20
435	CUL3	0.53	0.11	0.25	0.1	0.00	-1.21
436	LDB1	0.13	0.1	-0.14	0.1	0.01	-1.21

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
437	CAP2	-0.18	0.1	-0.45	0.15	0.02	-1.21
438	BUB1B	0.01	0.07	-0.26	0.08	0.05	-1.21
439	SAMHD1	0.34	0.03	0.06	0.06	0.01	-1.22
440	LETMD1	0.33	0.11	0.04	0.12	0.01	-1.22
441	RC2-BN0405-011-B04	0.41	0.1	0.13	0.18	0.03	-1.22
442	KCNAB2	0.05	0.14	-0.25	0.15	0.03	-1.23
443	CM0-MT0352-749-B12	0.38	0.1	0.08	0.06	0.03	-1.23
444	SEMA3F	0.09	0.06	-0.21	0.04	0.03	-1.23
445	DUSP16	0.3	0.32	0.00	0.43	0.04	-1.23
446	PDK3	-0.43	0.42	-0.72	0.35	0.04	-1.23
447	FN3KRP	0.11	0.07	-0.19	0.08	0.05	-1.23
448	INOC1	0.35	0.11	0.05	0.03	0.05	-1.23
449	C1orf9	0.2	0.14	-0.11	0.17	0.00	-1.24
450	CUL4A	-0.14	0.13	-0.45	0.11	0.01	-1.24
451	MKKS	-0.03	0.17	-0.34	0.13	0.02	-1.24
452	PRPSAP1	0.38	0.3	0.07	0.22	0.04	-1.24
453	SMPD4	-0.31	0.12	-0.62	0.02	0.04	-1.24
454	NF2	0.09	0.14	-0.24	0.19	0.01	-1.25
455	CCL18	0.42	0.05	0.09	0.03	0.02	-1.25
456	QV1-HT0311-080-G05	-0.78	0.17	-1.1	0.05	0.04	-1.25
457	TDRKH	0.04	0.05	-0.29	0.16	0.04	-1.25
458	RC3-BT0253-013-E03	0.18	0.18	-0.14	0.3	0.04	-1.25
459	SMPD1	-0.6	0.22	-0.94	0.18	0.03	-1.26
460	HLA-DOB	0.1	0.07	-0.23	0.08	0.04	-1.26
461	ARHGDIB	-0.03	0.05	-0.37	0.11	0.05	-1.26
462	RAB1B	-0.31	0.06	-0.66	0.04	0.00	-1.27
463	PRKCH	-0.18	0.1	-0.53	0.1	0.01	-1.27
464	TAF13	0.43	0.09	0.08	0.15	0.02	-1.27
465	ANLN	-0.24	0.06	-0.58	0.14	0.02	-1.27
466	DOCK7	-0.03	0.14	-0.38	0.04	0.03	-1.27
467	NIPA2	0.27	0.29	-0.07	0.39	0.03	-1.27
468	POLK	0.41	0.25	0.06	0.19	0.04	-1.27
469	C9orf41	0.62	0.14	0.27	0.1	0.01	-1.28
470	ZC3H15	-2.13	0.21	-2.49	0.16	0.02	-1.28
471	MOBKL2B	-0.99	0.24	-1.34	0.14	0.05	-1.28
472	ENOX2	0.08	0.04	-0.28	0.18	0.05	-1.28
473	RCBTB1	0.13	0.05	-0.23	0.07	0.00	-1.29
474	SLC25A23	-0.11	0.09	-0.48	0.16	0.02	-1.29
475	MR3-GN0185-009-F01	-0.13	0.21	-0.49	0.12	0.02	-1.29
476	TSPAN3	-0.24	0.18	-0.61	0.23	0.01	-1.30
477	CM3-NN1040-156-A08	-0.97	0.22	-1.35	0.18	0.02	-1.30
478	DNAJC10	-1.5	0.19	-1.89	0.16	0.00	-1.31
479	FRAP1	0.35	0.07	-0.04	0.04	0.02	-1.31
480	LITAF	-0.18	0.64	-0.57	0.53	0.02	-1.31
481	SPINT2	-4.66	0.47	-5.05	0.57	0.03	-1.31
482	CREM	0.67	0.07	0.28	0.15	0.04	-1.31
483	PPM2C	0.71	0.09	0.3	0.04	0.01	-1.32
484	CA3	0.34	0.24	-0.06	0.31	0.03	-1.32
485	RPP38	0.01	0.08	-0.39	0.18	0.04	-1.32
486	MR3-GN0185-012-B11	-0.2	0.3	-0.61	0.34	0.01	-1.33
487	MCPH1	-0.33	0.12	-0.74	0.06	0.03	-1.33
488	C6orf89	0.31	0.13	-0.1	0.2	0.05	-1.33
489	PM2-CT0804-001-A05	0.33	0.16	-0.09	0.2	0.00	-1.34
490	IFT20	0.45	0.07	0.02	0.1	0.01	-1.34

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
491	SUMF1	1.83	0.4	1.41	0.45	0.02	-1.34
492	LOC643836	-1.11	0.1	-1.54	0.19	0.02	-1.34
493	BCAT2	0.26	0.15	-0.17	0.11	0.02	-1.34
494	VAMP3	1.37	0.24	0.94	0.3	0.03	-1.34
495	C8orf76	-1.04	0.1	-1.47	0.19	0.03	-1.34
496	FKBP9	-0.02	0.22	-0.45	0.1	0.03	-1.34
497	LANCL1	-0.02	0.07	-0.44	0.12	0.04	-1.34
498	HOXC10	-0.44	0.18	-0.86	0.21	0.04	-1.34
499	ODZ4	0.4	0.26	-0.03	0.18	0.01	-1.35
500	ARL1	0.79	0.5	0.36	0.58	0.01	-1.35
501	GLB1	-0.35	0.04	-0.78	0.08	0.01	-1.35
502	RNF130	-0.26	0.1	-0.69	0.16	0.02	-1.35
503	CM0-HT0331-125-A02	0.45	0.33	0.02	0.2	0.03	-1.35
504	EPB41L1	-0.29	0.42	-0.72	0.32	0.03	-1.35
505	RCOR3	-0.25	0.04	-0.7	0.09	0.01	-1.36
506	FLJ11506	-0.56	0.06	-1.01	0.09	0.02	-1.36
507	ATPAF1	0.39	0.11	-0.06	0.06	0.02	-1.36
508	HLCS	0.07	0.35	-0.37	0.23	0.03	-1.36
509	MR2-EN0093-007-E12	0.89	0.24	0.43	0.29	0.01	-1.38
510	STAR	-0.18	0.23	-0.64	0.16	0.02	-1.38
511	COMMD3	0.54	0.14	0.08	0.18	0.02	-1.38
512	ZZZ3	-0.39	0.2	-0.85	0.19	0.03	-1.38
513	C19orf43	0.1	0.06	-0.37	0.09	0.01	-1.39
514	RHOBTB1	1.85	0.27	1.38	0.32	0.02	-1.39
515	CM1-FN0105-295-F02	0.4	0.08	-0.08	0.19	0.03	-1.39
516	QV2-BT0636-444-A04	0.12	0.08	-0.35	0.12	0.04	-1.39
517	MR0-UT0049-108-H05	0.22	0.2	-0.25	0.29	0.04	-1.39
518	CDK7	-0.5	0.2	-0.98	0.1	0.05	-1.39
519	RC4-HT0781-011-A07	0.6	0.19	0.13	0.02	0.05	-1.39
520	RBM28	-0.29	0.03	-0.78	0.07	0.00	-1.40
521	SAT1	0.99	0.52	0.51	0.46	0.01	-1.40
522	RHOQ	3.34	0.19	2.86	0.17	0.03	-1.40
523	CORO2A	-0.6	0.11	-1.08	0.08	0.05	-1.40
524	CYB5R4	-1.69	0.14	-2.19	0.08	0.02	-1.41
525	ANKIB1	0.48	0.08	-0.02	0.08	0.02	-1.41
526	HSF2	-0.5	0.06	-1.00	0.19	0.04	-1.41
527	FGFBP3	-0.31	0.12	-0.82	0.1	0.01	-1.42
528	CCDC55	0.1	0.31	-0.41	0.28	0.01	-1.42
529	PTPN4	2.59	0.15	2.08	0.1	0.00	-1.43
530	KLHL5	0.16	0.23	-0.36	0.25	0.01	-1.43
531	ZNF559	0.15	0.11	-0.37	0.26	0.03	-1.43
532	PM3-BN0257-007-B06	-0.27	0.16	-0.8	0.17	0.00	-1.44
533	CM1-FN0039-254-H12	0.49	0.17	-0.04	0.18	0.01	-1.44
534	PRKCZ	-0.4	0.03	-0.93	0.14	0.03	-1.44
535	INSIG2	1.2	0.4	0.67	0.38	0.03	-1.44
536	CDC14A	-0.86	0.11	-1.39	0.09	0.04	-1.44
537	RCL1	0.18	0.02	-0.35	0.18	0.04	-1.44
538	MAGI1	0.99	0.28	0.45	0.29	0.01	-1.46
539	GNA12	1.71	0.1	1.16	0.19	0.03	-1.46
540	VWA1	0.04	0.13	-0.51	0.33	0.04	-1.46
541	PIK3CA	-0.73	0.12	-1.28	0.27	0.04	-1.46
542	MR2-OT0079-008-A11	0.84	0.12	0.3	0.11	0.05	-1.46
543	LMNB2	-0.38	0.23	-0.94	0.27	0.00	-1.47
544	PTPN18	0.28	0.15	-0.28	0.03	0.03	-1.47

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
545	STXBP3	0.48	0.18	-0.07	0.01	0.04	-1.47
546	TARBP1	0.54	0.25	-0.02	0.06	0.04	-1.47
547	MED10	-0.29	0.34	-0.86	0.31	0.02	-1.48
548	CAPN7	0.04	0.08	-0.53	0.17	0.02	-1.48
549	SH2D1B	0.53	0.05	-0.04	0.12	0.02	-1.48
550	RAD51C	-0.48	0.11	-1.05	0.08	0.02	-1.48
551	CD5	0.24	0.42	-0.34	0.4	0.02	-1.49
552	MAD2L2	-0.65	0.13	-1.23	0.24	0.02	-1.49
553	RC2-HT0977-017-C12	1.42	0.1	0.84	0.23	0.03	-1.49
554	CCDC14	0.00	0.13	-0.57	0.3	0.05	-1.49
555	INPP1	-1.34	0.27	-1.93	0.4	0.03	-1.50
556	RIT1	0.01	0.19	-0.58	0.11	0.01	-1.51
557	RC74	0.57	0.15	-0.02	0.18	0.02	-1.51
558	BCL10	0.92	0.27	0.33	0.11	0.03	-1.51
559	MAEA	1.38	0.09	0.79	0.17	0.04	-1.51
560	C7orf44	-0.62	0.1	-1.22	0.22	0.05	-1.51
561	MR4-NT0142-101-G10	0.49	0.17	-0.12	0.23	0.03	-1.52
562	QV4-BN0090-299-C09	0.1	0.08	-0.5	0.3	0.04	-1.52
563	KIAA0274	0.62	0.06	0.01	0.03	0.00	-1.53
564	C17orf32	-0.64	0.26	-1.26	0.25	0.00	-1.54
565	PECI	-0.04	0.18	-0.67	0.24	0.01	-1.54
566	LACTB2	0.03	0.29	-0.6	0.16	0.02	-1.54
567	STARD13	3.56	0.23	2.94	0.17	0.03	-1.54
568	SR140	0.21	0.21	-0.42	0.23	0.00	-1.55
569	KLK6	-1.62	0.33	-2.26	0.28	0.00	-1.55
570	QV2-LT0039-107-H08	-0.8	0.13	-1.44	0.16	0.00	-1.55
571	CCDC106	0.09	0.04	-0.54	0.09	0.01	-1.55
572	DDX50	0.47	0.24	-0.16	0.08	0.03	-1.55
573	KARS	0.04	0.12	-0.6	0.17	0.03	-1.55
574	IARS	-0.03	0.16	-0.67	0.23	0.00	-1.56
575	ELK3	2.07	0.15	1.42	0.27	0.03	-1.56
576	MR0-BN0115-004-D07	0.8	0.09	0.15	0.14	0.03	-1.57
577	UFC1	0.17	0.28	-0.48	0.23	0.04	-1.57
578	N4BP1	0.63	0.08	-0.02	0.13	0.03	-1.58
579	CHCHD7	-0.31	0.24	-0.97	0.1	0.03	-1.58
580	PM0-AN0032-002-C10	-0.59	0.1	-1.26	0.15	0.01	-1.59
581	CTSH	-3.15	0.21	-3.83	0.04	0.04	-1.59
582	C5orf22	0.04	0.25	-0.64	0.15	0.03	-1.60
583	NFYC	0.71	0.12	0.03	0.26	0.04	-1.60
584	SPG20	1.39	0.19	0.69	0.11	0.01	-1.62
585	FLOT1	-0.57	0.13	-1.27	0.25	0.03	-1.62
586	EVI2B	1.15	0.4	0.45	0.22	0.03	-1.62
587	POLR2H	-0.95	0.25	-1.64	0.09	0.03	-1.62
588	C3orf1	0.32	0.12	-0.38	0.32	0.04	-1.62
589	CM0-CN0039-231-F08	0.92	0.44	0.22	0.19	0.04	-1.62
590	ANXA8	-1.79	0.53	-2.48	0.54	0.04	-1.62
591	CD22	0.18	0.19	-0.52	0.17	0.01	-1.63
592	GABRB3	0.47	0.17	-0.24	0.02	0.02	-1.63
593	ANKRD28	1.26	0.21	0.56	0.2	0.03	-1.63
594	LRRC6	0.73	0.07	0.02	0.03	0.01	-1.64
595	MTMR1	0.71	0.42	0.00	0.28	0.02	-1.64
596	AZI2	1.29	0.08	0.58	0.12	0.02	-1.64
597	SMEK2	0.26	0.17	-0.47	0.11	0.00	-1.65
598	CM1-BT0738-200-G11	1.67	0.1	0.95	0.18	0.01	-1.65

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
599	GOLPH2	-0.01	0.2	-0.73	0.27	0.01	-1.65
600	C11orf17	0.2	0.14	-0.52	0.28	0.02	-1.65
601	CDH1	-0.34	0.31	-1.06	0.46	0.03	-1.65
602	QV0-ST0294-173-B06	-0.39	0.2	-1.11	0.17	0.04	-1.65
603	ZCCHC17	0.78	0.06	0.04	0.19	0.02	-1.66
604	MTFMT	0.15	0.01	-0.59	0.15	0.01	-1.67
605	RAB2A	1.29	0.53	0.55	0.35	0.02	-1.67
606	FAM33A	-0.27	0.24	-1.01	0.12	0.04	-1.67
607	NUDCD3	-0.33	0.07	-1.08	0.14	0.01	-1.68
608	SORBS1	0.26	0.18	-0.5	0.1	0.01	-1.69
609	C9orf114	0.39	0.05	-0.37	0.2	0.02	-1.69
610	RC4-BN0408-012-F06	-0.05	0.12	-0.81	0.28	0.04	-1.69
611	PM3-HT0909-014-B03	0.5	0.24	-0.27	0.36	0.01	-1.70
612	RHOT1	-0.55	0.24	-1.32	0.06	0.02	-1.70
613	IFNAR2	-0.16	0.16	-0.92	0.07	0.02	-1.70
614	QV3-LT0048-068-A05	0.22	0.47	-0.55	0.53	0.00	-1.71
615	PCYOX1	0.19	0.14	-0.58	0.15	0.04	-1.71
616	PELI1	0.23	0.06	-0.55	0.08	0.01	-1.72
617	TM2D3	0.35	0.13	-0.45	0.17	0.00	-1.74
618	GTF2E2	1.17	0.07	0.37	0.17	0.01	-1.74
619	DDOST	0.56	0.01	-0.25	0.28	0.04	-1.75
620	TTC35	-0.16	0.08	-0.97	0.28	0.05	-1.75
621	GPATCH8	0.43	0.12	-0.38	0.16	0.00	-1.76
622	METTL6	0.25	0.08	-0.56	0.12	0.01	-1.76
623	FLJ23861	0.79	0.11	-0.02	0.26	0.02	-1.76
624	SYPL1	0.02	0.44	-0.79	0.2	0.04	-1.76
625	KIF21B	-0.94	0.15	-1.76	0.44	0.04	-1.76
626	CM1-UM0031-139-H08	-0.68	0.2	-1.49	0.16	0.05	-1.76
627	C1orf25	0.87	0.09	0.04	0.18	0.01	-1.77
628	PHF11	1.56	0.17	0.74	0.3	0.02	-1.77
629	VRK2	-0.91	0.2	-1.74	0.42	0.03	-1.77
630	DES	0.81	0.84	-0.03	0.76	0.03	-1.78
631	CHMP2A	-1.57	0.19	-2.4	0.2	0.03	-1.78
632	RAB40B	-0.09	0.17	-0.93	0.42	0.04	-1.78
633	CAT	2.45	0.19	1.61	0.05	0.01	-1.79
634	ZNF274	-0.19	0.11	-1.04	0.11	0.02	-1.79
635	UBE1DC1	0.07	0.21	-0.77	0.06	0.02	-1.79
636	ABI2	0.14	0.23	-0.69	0.04	0.03	-1.79
637	GALNT11	0.81	0.46	-0.03	0.15	0.04	-1.79
638	TSC22D3	0.01	0.25	-0.84	0.18	0.01	-1.80
639	PALM2-AKAP2	3.52	0.44	2.67	0.65	0.02	-1.80
640	GTPBP8	0.05	0.16	-0.81	0.25	0.01	-1.82
641	CHPT1	-0.47	0.11	-1.34	0.2	0.03	-1.82
642	PDGFC	2.76	0.18	1.89	0.44	0.03	-1.82
643	MRPS28	0.29	0.54	-0.58	0.58	0.00	-1.83
644	CORO1C	2.12	0.32	1.25	0.23	0.00	-1.83
645	ELF3	0.57	0.22	-0.3	0.22	0.01	-1.83
646	AAAS	-0.51	0.19	-1.38	0.24	0.02	-1.83
647	CDKN1B	-0.74	0.28	-1.62	0.23	0.00	-1.84
648	URG4	-0.29	0.14	-1.17	0.04	0.01	-1.84
649	SRP72	0.69	0.17	-0.19	0.07	0.01	-1.84
650	BCAT1	2.59	0.25	1.71	0.13	0.05	-1.84
651	CM0-PT0049-140-D01	2.01	0.52	1.12	0.49	0.05	-1.85
652	GPR98	0.00	0.16	-0.91	0.07	0.02	-1.87

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
653	NNT	0.35	0.53	-0.56	0.34	0.02	-1.88
654	CYFIP2	-0.81	0.33	-1.73	0.36	0.04	-1.88
655	BLOC1S1	0.11	0.3	-0.82	0.15	0.03	-1.90
656	HSF4	-0.51	0.2	-1.44	0.37	0.01	-1.91
657	FBXO34	-0.64	0.29	-1.57	0.06	0.03	-1.91
658	RBM3	1.52	0.24	0.57	0.12	0.01	-1.94
659	EIF3S3	-1.15	0.19	-2.1	0.28	0.03	-1.94
660	EIF1B	0.76	0.53	-0.19	0.26	0.03	-1.94
661	TMEM123	-0.13	0.32	-1.1	0.27	0.00	-1.95
662	TMEM126B	0.01	0.14	-0.95	0.35	0.04	-1.95
663	MRPL39	-0.99	0.08	-1.95	0.31	0.04	-1.95
664	ITPR3	0.06	0.31	-0.91	0.19	0.01	-1.96
665	UBE2L6	1.03	0.06	0.06	0.29	0.02	-1.96
666	CM1-BT0738-205-G06	-0.76	0.22	-1.73	0.06	0.02	-1.96
667	RAB4A	1.19	0.27	0.21	0.05	0.02	-1.97
668	RPL37A	0.62	0.46	-0.36	0.21	0.02	-1.98
669	RPL22	1.5	0.23	0.51	0.29	0.04	-1.99
670	PRKAG2	-1.03	0.59	-2.03	0.55	0.04	-2.00
671	SEL1L	-0.19	0.33	-1.2	0.19	0.01	-2.01
672	FLJ20160	-0.34	0.36	-1.35	0.34	0.05	-2.01
673	PTPRC	0.49	0.16	-0.52	0.23	0.02	-2.02
674	QV3-OT0063-165-A05	1.19	0.09	0.18	0.27	0.02	-2.02
675	HECTD3	-0.7	0.11	-1.72	0.41	0.05	-2.02
676	ERRF1	-0.04	0.06	-1.06	0.08	0.00	-2.03
677	TMEM9B	1.5	0.23	0.48	0.07	0.01	-2.03
678	NUDT5	0.65	0.06	-0.37	0.2	0.01	-2.03
679	ZHX2	-0.7	0.33	-1.72	0.59	0.03	-2.03
680	RGS2	1.39	0.38	0.37	0.19	0.05	-2.03
681	GLT8D1	1.22	0.14	0.2	0.24	0.00	-2.04
682	CHAF1A	0.94	0.48	-0.09	0.19	0.04	-2.04
683	LGTM	-0.61	0.15	-1.65	0.43	0.03	-2.05
684	COQ9	-1.04	0.51	-2.09	0.6	0.02	-2.07
685	SEC31A	1.84	0.14	0.79	0.28	0.03	-2.07
686	COPS6	0.6	0.06	-0.46	0.29	0.02	-2.08
687	TMEM49	1.64	0.2	0.58	0.17	0.02	-2.08
688	IFNGR1	-0.12	0.36	-1.19	0.56	0.02	-2.10
689	ZNF335	0.27	0.3	-0.81	0.03	0.03	-2.11
690	PFKP	0.67	0.17	-0.41	0.38	0.05	-2.11
691	MR3-HT1104-002-G11	1.5	0.22	0.42	0.15	0.01	-2.12
692	HSP90B1	0.46	0.1	-0.63	0.09	0.00	-2.13
693	QV3-DT0044-045-A10	1.44	0.11	0.35	0.24	0.00	-2.13
694	CM1-BN0020-176-E11	-0.18	0.38	-1.27	0.26	0.01	-2.13
695	ATP5L	0.37	0.27	-0.72	0.29	0.01	-2.13
696	SFRS7	0.38	0.62	-0.72	0.35	0.02	-2.14
697	TTYH3	1.18	0.12	0.07	0.06	0.01	-2.15
698	SLC9A7	2.81	0.26	1.7	0.13	0.02	-2.16
699	NGFRAP1	0.56	0.17	-0.56	0.34	0.04	-2.16
700	LOXL2	4.48	0.63	3.36	0.59	0.00	-2.17
701	ADORA2B	-0.04	0.42	-1.16	0.07	0.03	-2.17
702	DNAJA3	-0.68	0.09	-1.81	0.07	0.00	-2.18
703	HN1	0.13	0.39	-1.01	0.3	0.00	-2.20
704	MGST2	0.02	0.38	-1.13	0.3	0.00	-2.21
705	ATG12	1.08	0.05	-0.06	0.08	0.00	-2.21
706	LOC644246	1.00	0.96	-0.17	0.67	0.04	-2.24

nº	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
707	PM0-HT0911-010-D01	1.87	0.3	0.69	0.24	0.01	-2.27
708	ASAH1	1.62	0.38	0.44	0.4	0.04	-2.27
709	MR3-HN0123-001-C12	1.11	0.03	-0.08	0.09	0.00	-2.28
710	EVPL	1.21	0.23	0.03	0.19	0.04	-2.28
711	AQP3	0.43	0.27	-0.77	0.18	0.03	-2.29
712	EXOC3L2	-0.33	0.27	-1.53	0.35	0.03	-2.29
713	CDC27	-0.76	0.11	-1.96	0.14	0.01	-2.30
714	URM1	0.85	0.71	-0.36	0.61	0.02	-2.32
715	JMJD6	1.37	0.26	0.16	0.12	0.03	-2.32
716	ZYG11B	-0.23	0.3	-1.45	0.14	0.04	-2.34
717	NCKAP1L	1.02	0.16	-0.21	0.23	0.01	-2.35
718	ACTR10	-0.5	0.08	-1.74	0.12	0.01	-2.36
719	C1QB	0.52	0.18	-0.73	0.35	0.01	-2.38
720	MR1-CT0529-002-E09	1.74	0.94	0.48	0.59	0.03	-2.39
721	ETNK2	0.79	0.18	-0.47	0.39	0.05	-2.39
722	RC6-ST0198-011-G01	-0.05	0.3	-1.31	0.12	0.01	-2.40
723	C1orf50	0.68	0.19	-0.59	0.19	0.00	-2.41
724	PRR8	0.37	0.29	-0.9	0.52	0.01	-2.41
725	MED4	0.11	0.06	-1.15	0.48	0.04	-2.41
726	CCDC90B	0.55	0.23	-0.73	0.25	0.01	-2.43
727	GZMB	0.13	0.38	-1.17	0.54	0.01	-2.45
728	HMCN1	3.75	0.46	2.46	0.53	0.04	-2.45
729	FUBP1	0.09	0.6	-1.21	0.35	0.03	-2.46
730	RALA	-0.6	0.4	-1.91	0.36	0.01	-2.49
731	CCDC91	1.17	0.11	-0.16	0.13	0.01	-2.51
732	MGST3	1.4	0.37	0.05	0.64	0.02	-2.54
733	CYB5D2	-0.89	0.67	-2.24	0.74	0.03	-2.55
734	XRCC6BP1	-1.23	0.63	-2.59	0.58	0.00	-2.57
735	STMN2	2.58	1.53	1.21	1.26	0.03	-2.58
736	GLCE	1.38	0.13	0.00	0.4	0.02	-2.60
737	COX5B	-0.5	0.17	-1.89	0.19	0.00	-2.63
738	DAPK1	1.49	0.78	0.09	1.09	0.02	-2.63
739	PTGS1	1.07	0.32	-0.35	0.32	0.01	-2.67
740	PSMC6	-1.39	0.21	-2.81	0.18	0.00	-2.68
741	ATP5H	0.43	0.18	-0.99	0.22	0.01	-2.68
742	PM0-LT0019-005-F04	0.03	0.21	-1.39	0.24	0.02	-2.68
743	CM1-DT0049-136-C09	0.41	0.49	-1.01	0.12	0.04	-2.68
744	ARL6IP5	1.88	0.43	0.45	0.29	0.03	-2.69
745	PLOD2	3.94	0.49	2.49	0.25	0.03	-2.72
746	KIAA1429	1.00	0.13	-0.45	0.42	0.05	-2.73
747	QV0-BN0040-160-B12	1.8	0.36	0.33	0.22	0.01	-2.76
748	HYPK	0.81	0.34	-0.67	0.3	0.01	-2.78
749	C4orf20	1.08	0.44	-0.4	0.18	0.02	-2.80
750	SNX5	1.61	0.39	0.11	0.12	0.01	-2.83
751	NENF	0.28	0.2	-1.23	0.36	0.03	-2.85
752	SKP1A	0.74	0.07	-0.79	0.29	0.01	-2.89
753	CHD8	0.23	0.13	-1.32	0.1	0.00	-2.93
754	GTF2A2	-0.44	0.06	-1.99	0.4	0.02	-2.93
755	C6orf170	0.28	0.03	-1.29	0.17	0.00	-2.96
756	UBE2V2	0.86	0.39	-0.7	0.15	0.03	-2.96
757	MOXD1	4.41	0.49	2.84	1.02	0.04	-2.97
758	NUDT5	0.44	0.28	-1.15	0.34	0.02	-3.00
759	MRPL22	-1.15	0.78	-2.74	0.5	0.02	-3.02
760	ZNF189	-0.48	0.46	-2.12	0.79	0.02	-3.12

n°	Gene	FN(+) m	FN(+) SD	FN(+)/MDA m	F(+)/MDA SD	p	Fold
761	LXN	1.43	0.34	-0.23	0.49	0.01	-3.15
762	TMSB4Y	1.88	0.36	0.22	0.45	0.01	-3.17
763	RC1-IT0013-022-C08	-0.15	0.2	-1.82	0.14	0.01	-3.17
764	JOSD3	0.51	0.56	-1.18	0.27	0.01	-3.23
765	ATP5J2	-0.31	0.06	-2.01	0.37	0.02	-3.24
766	LSM3	-0.25	0.28	-1.95	0.14	0.00	-3.26
767	PHYH	0.69	0.57	-1.02	0.2	0.02	-3.26
768	MRPS21	0.13	0.3	-1.64	0.28	0.00	-3.42
769	PMP22	2.8	0.36	1.02	0.69	0.05	-3.43
770	RC3-CI0043-024-D07	0.69	0.4	-1.12	0.3	0.02	-3.49
771	SDCCAG10	0.03	0.47	-1.81	0.3	0.04	-3.59
772	NOLA3	0.85	0.2	-1.03	0.3	0.01	-3.68
773	B2M	1.86	0.72	-0.27	0.45	0.04	-4.36
774	PPP1R12A	2.63	0.49	0.49	0.31	0.04	-4.40
775	CM0-TN0034-494-D11	0.12	0.41	-2.05	0.1	0.02	-4.50
776	TMED2	0.45	0.25	-1.83	0.61	0.04	-4.86
777	QV1-DT0070-339-E08	0.33	0.5	-2.02	0.3	0.00	-5.09
778	CM3-CI0002-352-H03	0.74	0.31	-1.68	0.59	0.03	-5.35
779	HDPY-30	0.46	0.25	-2.38	0.37	0.02	-7.16

Tabela Anexo 3- Genes diferencialmente expressos analisados por ANOVA em fibroblasto do linfonodo acometido [FN(+)], fibroblastos de linfonodo não acometido [FN(-)], fibroblasto de linfonodo acometido e cocultivado com célula epitelial MDA-MB231 [FN(+)/MDA] e fibroblasto de linfonodo não acometido cocultivado com célula epitelial MDA-MB231 [FN(-)/MDA] quando analisados sua expressão em lâmina de microarray, fold=variação de expresssão, p=significância.

Símbolo		FN(-)x FN(+) fold	FN(-)x FN(+) p	FN(-)x FN(-)MD fold	FN(-)x FN(-)MD p	FN(-)x FN(+)/MD fold	FN(-)x FN(+)/MD p	FN(+)x FN(-)MD fold	FN(+)x FN(-)MD p	FN(+)x FN(+)MD fold	FN(+)x FN(+)MD p	FN(-)MDx FN(+)MD fold	FN(-)MDx FN(+)MD p
1	ANK2	-1.41	0.01	-1.42	0.01	-1.52	0.00	-1.00	1.00	-1.08	0.75	-1.07	0.78
2	GPBP1	-1.11	0.94	2.47	0.01	1.15	0.87	2.74	0.00	1.28	0.58	-2.14	0.02
3	ATF6	-1.69	0.01	-1.11	0.83	1.01	1.00	1.52	0.03	1.70	0.01	1.12	0.80
4	TM9SF3	1.47	0.01	1.78	0.00	1.72	0.00	1.21	0.22	1.17	0.35	-1.03	0.98
5	MRPS2	-1.02	0.95	1.04	0.74	1.29	0.00	1.06	0.45	1.32	0.00	1.24	0.00
6	MR2-EN0093-001-E11	-1.17	0.83	2.17	0.01	-1.10	0.96	2.53	0.00	1.07	0.98	-2.38	0.01
7	C1orf108	-1.00	1.00	-1.31	0.03	-1.01	1.00	-1.30	0.03	-1.00	1.00	1.30	0.03
8	CALU	-1.07	0.99	-2.68	0.01	-1.14	0.92	-2.51	0.01	-1.07	0.99	2.35	0.02
9	EDG1	-1.01	1.00	1.39	0.01	-1.04	0.95	1.40	0.01	-1.03	0.97	-1.45	0.01
10	DAP3	1.18	0.07	1.43	0.00	2.16	0.00	1.21	0.05	1.82	0.00	1.51	0.00
11	ATP6V1A	-1.11	0.93	1.44	0.27	3.23	0.00	1.60	0.12	3.60	0.00	2.25	0.01
12	HECTD1	-1.69	0.01	-1.66	0.01	-1.69	0.01	1.01	1.00	1.00	1.00	-1.01	1.00
13	NCKAP1L	-1.19	0.68	-1.40	0.20	-2.79	0.00	-1.18	0.72	-2.35	0.00	-2.00	0.01
14	DCUN1D4	-1.01	1.00	-1.96	0.02	1.06	0.99	-1.94	0.02	1.06	0.98	2.07	0.01
15	C6orf170	-1.35	0.00	-3.75	0.00	-4.00	0.00	-2.78	0.00	-2.96	0.00	-1.07	0.69
16	BMI1	1.54	0.02	-1.07	0.92	-1.07	0.91	-1.64	0.01	-1.65	0.01	-1.00	1.00
17	COPE	-1.08	0.99	1.10	0.98	2.65	0.02	1.19	0.89	2.88	0.01	2.42	0.03
18	PSMB9	-1.97	0.02	-2.19	0.01	-2.35	0.01	-1.11	0.94	-1.19	0.77	-1.07	0.98
19	MAP2K3	1.05	0.99	1.41	0.21	3.57	0.00	1.34	0.32	3.40	0.00	2.53	0.00
20	N4BP1	1.55	0.01	1.02	1.00	-1.01	1.00	-1.52	0.01	-1.57	0.00	-1.03	0.98
21	AKAP8L	-2.28	0.00	-2.62	0.00	-2.69	0.00	-1.15	0.78	-1.18	0.69	-1.03	1.00
22	SRCAP	-1.04	0.93	1.08	0.70	1.80	0.00	1.12	0.38	1.87	0.00	1.67	0.00
23	PSMA5	-2.55	0.01	-3.69	0.00	-2.93	0.00	-1.45	0.36	-1.15	0.91	1.26	0.71
24	QV2-LT0039-107-H08	-1.03	0.96	-1.10	0.49	-1.60	0.00	-1.07	0.76	-1.55	0.00	-1.46	0.00
25	ELN	1.07	0.98	1.34	0.38	2.58	0.00	1.25	0.58	2.41	0.00	1.92	0.02
26	MRC2	-1.05	0.99	-1.07	0.98	1.79	0.04	-1.02	1.00	1.88	0.03	1.91	0.02
27	MAP1LC3B	1.14	0.93	1.20	0.83	3.00	0.00	1.05	1.00	2.63	0.01	2.50	0.01
28	CREG1	1.13	0.84	-3.37	0.00	-1.55	0.06	-3.80	0.00	-1.74	0.02	2.18	0.00
29	RCOR3	-1.03	0.98	-1.04	0.95	-1.39	0.01	-1.01	1.00	-1.36	0.01	-1.34	0.01
30	RBM28	1.44	0.01	1.03	0.98	1.03	0.98	-1.40	0.01	-1.40	0.01	1.00	1.00
31	UBE1DC1	1.03	0.98	-1.25	0.09	-1.73	0.00	-1.29	0.06	-1.79	0.00	-1.38	0.02

Símbolo	FN(-)x FN(+) fold	FN(-)x FN(+) p	FN(-)x FN(-)MD fold	FN(-)x FN(-)MD p	FN(-)x FN(+MD fold	FN(-)x FN(+MD p	FN(+)x FN(-)MD fold	FN(+)x FN(-)MD p	FN(+)x FN(+MD fold	FN(+)x FN(+MD p	FN(-)MDx FN(+MD fold	FN(-)MDx FN(+MD p
32 DNAJC12	-1.61	0.01	-1.67	0.01	-1.67	0.01	-1.04	0.98	-1.04	0.99	1.00	1.00
33 TMEM153	-1.03	1.00	-1.01	1.00	1.57	0.03	1.02	1.00	1.61	0.02	1.58	0.03
34 C22orf9	-1.01	1.00	1.04	0.99	1.52	0.02	1.05	0.98	1.54	0.02	1.47	0.04
35 PRMT2	1.02	1.00	-1.92	0.01	-1.11	0.88	-1.96	0.01	-1.14	0.81	1.73	0.02
36 TOM1	-1.10	0.93	-1.02	1.00	1.96	0.01	1.08	0.96	2.15	0.00	1.99	0.01
37 MAP3K12	-1.02	1.00	1.15	0.82	2.17	0.01	1.17	0.76	2.21	0.01	1.88	0.02
38 GPR98	-1.10	0.95	1.05	0.99	-2.04	0.01	1.15	0.84	-1.87	0.03	-2.15	0.01
39 METTL6	-1.11	0.79	-1.19	0.45	-1.95	0.00	-1.07	0.92	-1.76	0.00	-1.65	0.01
40 CHES1	1.17	0.49	1.34	0.10	2.42	0.00	1.14	0.64	2.06	0.00	1.81	0.00
41 LRP3	1.00	1.00	-1.06	0.98	1.94	0.01	-1.06	0.98	1.94	0.01	2.06	0.01
42 ZNF96	1.41	0.01	1.40	0.01	1.41	0.01	-1.01	1.00	-1.00	1.00	1.01	1.00

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJCC - Cancer staging handbook – 6^a ed. Springer-Verlag. 2002

Abruzzo LV, Lee KY, Fuller A, Silverman A, Keating MJ, Medeiros LJ, Coombes KR. Validation of oligonucleotide microarray data using microfluidic low-density arrays: a new statistical method to normalize real-time RT-PCR data. *Biotechniques*. 2005; 38, 5:785-92.

Aerts JL, Gonzales MI, Topalian SL. Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques*. 2004; 36, 1:84-6, 88, 90-1.

Baird K, Davis S, Antonescu CR, Harper UL, Walker RL, Chen Y, Glatfelter AA, Duray PH, Meltzer PS: Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res*. 2005; 65:9226-35.

Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005; 21, 3:389-95.

Bemis LT, Schedin P. Reproductive state of rat mammary gland stroma modulates human breast cancer cell migration and invasion. *Cancer Res*. 2000; 60, 13:3414-8.

Benoy IH, Elst H, Van der Auwera I, Van Laere S, van Dam P, Van Marck E, Scharpé S, Vermeulen PB, Dirix LY. Real-time RT-PCR correlates with immunocytochemistry for the detection of disseminated epithelial cells in bone marrow aspirates of patients with breast cancer. *Br J Cancer*. 2004;91, 10: 1813-20.

Bergamaschi A, Tagliabue E, Sørli T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R, Russnes H, Nesland J, Tammi R, Auvinen P, Kosma VM, Ménard S, Børresen-Dale AL. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol*. 2007.

Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*. 2002; 70, 9-10:537-46.

Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1, 1:46-54.

Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S, Reis EM, Neves EJ, de Souza SJ, Carvalho AF, Brentani H, Reis LF. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005; 54:95-105.

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

Carujo S, Estanyol JM, Ejarque A, Agell N, Bachs O, Pujol MJ. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a SET-binding protein and regulates cyclin B-cdk1 activity. *Oncogene*. 2006; 25, 29:4033-42.

Castelló R, Estellés A, Vázquez C, Falcó C, España F, Almenar SM, Fuster C, Aznar J. Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1, and tissue metalloproteinase inhibitor type 1 gene expressions in primary breast cancer. *Clin Chem*. 2002; 48,8:1288-95.

Cavallaro U, Christofori G. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1014:58-66.

Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW, Chen CL, Shu HF, Li H. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14:437-43.

Clark JL, Nguyen PL, Jaszcz WB, Jatoi A, Niehans GA. Prognostic variables in male breast cancer. *Am Surg*. 2000; 66, 5:502-11.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robins: pathologic basis of disease. 6^a ed. Philadelphia W.B. Saunders Company; 1999.p.1093-95.

de Cremoux P, Bieche I, Tran-Perennou C, Vignaud S, Boudou E, Asselain B, Lidereau R, Magdelénat H, Becette V, Sigal-Zafrani B, Spyrtos F. Inter-laboratory quality control for hormone-dependent gene expression in human breast tumors using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocr Relat Cancer*. 2004; 11, 3:489-95.

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; 6:59.

Di Bacco A, Gill G. The secreted glycoprotein CREG inhibits cell growth dependent on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Oncogene*. 2003; 22, 35:5436-45.

Dong-Le Bourhis X, Berthois Y, Millot G, Degeorges A, Sylvi M, Martin PM, Calvo F. Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumorous breast tissue on the proliferation of human breast cancer cell lines in co-culture. *Int J Cancer*. 1997; 71, 1:42-8.

Erkens T, Van Poucke M, Vandesompele J, Goossens K, Van Zeveren A, Peelman LJ. Development of a new set of reference genes for normalization of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and evaluation with PPARGC1A. *BMC Biotechnol*. 2006; 6:41.

Farber E. Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G. H. A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res.* 1984; 44, 12 Pt 1:5463-74.

Feltes CM, Kudo A, Blaschuk O, Byers SW. An alternatively spliced cadherin-11 enhances human breast cancer cell invasion. *Cancer Res.* 2002; 62, 22:6688-97.

Feroze-Merzoug F, Berquin IM, Dey J, Chen YQ. Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) as a preferred internal control over GAPDH and beta-actin in quantitative RNA analyses. *Biotechniques.* 2002; 32, 4:776-8, 780, 782.

Ferreira CG, Rocha JC. Oncogenes e genes supressores de tumor: Silva, R.L.A. *Oncologia molecular.* São Paulo: Editora Atheneu; 2004. Cap.3 e p. 29 – 43.

Ferreira CG, Rocha JC. O genoma humano e o câncer: Silva, R.L.A. *Oncologia molecular.* São Paulo: Editora Atheneu; 2004. Cap.3 e p. 29 – 43. Parmigiani, R. B., Camargo, A. A.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3 6:453-8.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ – Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; 124, 7:966-78.

Folgueira MA, Carraro DM, Brentani H, Patrao DF, Barbosa EM, Netto MM, Caldeira JR, Katayama ML, Soares FA, Oliveira CT, Reis LF, Kaiano JH, Camargo LP, Vencio RZ, Snitcovsky IM, Makdissi FB, e Silva PJ, Goes JC, Brentani MM. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:7434-43.

Folgueira MA, Brentani H, Katayama ML, Patrão DF, Carraro DM, Mourão Netto M, Barbosa EM, Caldeira JR, Abreu AP, Lyra EC, Kaiano JH, Mota LD, Campos AH, Maciel MS, Dellamano M, Caballero OL, Brentani MM. Gene expression profiling of clinical stages II and III breast cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39, 8:1101-13.

Gills JJ, Castillo SS, Zhang C, Petukhov PA, Memmott RM, Hollingshead M, Warfel N, Han J, Kozikowski AP, Dennis PA. Phosphatidylinositol ether lipid analogues that inhibit AKT also independently activate the stress kinase, p38alpha, through MKK3/6-independent and -dependent mechanisms. *J Biol Chem.* 2007; 282, 37:27020-9.

Goossens K, Van Poucke M, Van Soom A, Vandesompele J, Van Zeveren A, Peelman LJ. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Dev Biol.* 2005; 5:27.

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

Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Ochiai A. Proliferative activity of intratumoral fibroblasts is closely correlated with lymph node and distant organ metastases of invasive ductal carcinoma of the breast. *American Journal of Pathology*. 2000; 156, 5.

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

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

Ishida M, Ohashi S, Kizaki Y, Naito J, Horiguchi K, Harigaya T. Expression profiling of mouse placental lactogen II and its correlative genes using a cDNA microarray analysis in the developmental mouse placenta. *J Reprod Dev*. 2007 Feb;53(1):69-76.

Janssens N, Janicot M, Perera T, Bakker A. Housekeeping genes as internal standards in cancer research. *Mol Diagn*. 2004; 8, 2:107-13.

Jin ZG, Lungu AO, Xie L, Wang M, Wong C, Berk BC. Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24, 7:1186-91.

Johansson S, Fuchs A, Okvist A, Karimi M, Harper C, Garrick T, Sheedy D, Hurd Y, Bakalkin G, Ekström TJ. Validation of endogenous controls for quantitative gene expression analysis: application on brain cortices of human chronic alcoholics. *Brain Res*. 2007;1132, 1:20-8.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica. Sistema imunitário e órgãos linfáticos*. Guanabara e Koogan. Oitava edição.p. 220 -240. 1995.

Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*. 2004;118, 3:277-9.

Kim BR, Nam HY, Kim SU, Kim SI, Chang YJ. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnol Lett*. 2003; 25, 21:1869-72.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98, 21:12072-7.

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

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, 14:4966-71.

Kurata S. Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. *J Biol Chem*. 2000; 275, 31:23413-6.

Kusner DJ, Barton JA, Wen KK, Wang X, Rubenstein PA, Iyer SS. Regulation of phospholipase D activity by actin. Actin exerts bidirectional modulation of Mammalian phospholipase D activity in a polymerization-dependent, isoform-specific manner. *J Biol Chem*. 2002; 27, 277:50683-92.

Kuźnicki J, Kordowska J, Puzianowska M, Woźniewicz BM. Calcyclin as a marker of human epithelial cells and fibroblasts. *Exp Cell Res*. 1992 ; 200, 2:425-30.

Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*, 2004; 83, 3:249-89.

Lakhani SR, Chaggar R, Davies S, Jones C, Collins N, Odel C, Stratton MR, O'Hare MJ. Genetic alterations in 'normal' luminal and myoepithelial cells of the breast. *J Pathol*. 1999;189, 4:496-503.

Landsverk HB, Carlson CR, Steen RL, Vossebein L, Herberg FW, Taskén K, Collas P. Regulation of anchoring of the RIIalpha regulatory subunit of PKA to AKAP95 by threonine phosphorylation of RIIalpha: implications for chromosome dynamics at mitosis. *J Cell Sci*. 2001; 114, Pt 18:3255-64.

Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*. 2005; 6:62.

LeBedis C, Chen K, Fallavollita L, Boutros T, Brodt P. Peripheral lymph node stromal cells can promote growth and tumorigenicity of breast carcinoma cells through the release of IGF-I and EGF. *Int J Cancer*. 2002; 100, 1:2 – 8.

Lee WJ, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ. Calcium transport and signaling in the mammary gland: targets for breast cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1765:235-55.

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

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

Lim JY, Kim H, Jeun SS, Kang SG, Lee KJ. Merlin inhibits growth hormone-regulated Raf-ERKs pathways by binding to Grb2 protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 340, 4:1151-7.

Liu, J.; Albers, M. W.; Chen, C.-M.; Schreiber, S. L.; Walsh, C. T. : Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 87: 2304-2308.

Luu HH, Zhou L, Haydon RC, Deyrup AT, Montag AG, Huo D, Heck R, Heizmann CW, Peabody TD, Simon MA, He TC. Increased expression of S100A6 is associated with decreased metastasis and inhibition of cell migration and anchorage independent growth in human osteosarcoma. *Cancer Lett*. 2005; 229, 1:135-48.

Martins SB, Marstad A, Collas P. In vitro modulation of the interaction between HA95 and LAP2beta by cAMP signaling. *Biochemistry*. 2003 ; 42, 35:10456-61.

Micke P, Ostman A. Tumor-stroma interaction: cancer associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy?. *Lung Cancer*. 2004; 45, Suppl. 2:S163-S175.

Micke P, Kappert K, Ohshima M, Sundquist C, Scheidl S, Lindahl P, Heldin CH, Botling J, Ponten F, Ostman A. In situ identification of genes regulated specifically in fibroblasts of human basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2007;127(6):1516-23.

Mikheev AM, Mikheeva SA, Rostomily R, Zarbl H. Micke et al Dickkopf-1 activates cell death in MDA-MB435 melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;19;352(3):675-80.

Mogal A, Abdulkadir SA. Effects of Histone Deacetylase Inhibitor (HDACi); Trichostatin-A (TSA) on the expression of housekeeping genes. *Mol Cell Probes*. 2006; 20, 2:81-6.

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

Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC. Targeted deletion of the suppressor gene bin1/amphiphysin2 accentuates the neoplastic character of transformed mouse fibroblasts. *Cancer Biol Ther*. 2004; 3, 12:1236-42.

Nakanishi T, Karp JE, Tan M, Doyle LA, Peters T, Yang W, Wei D, Ross DD. Quantitative analysis of breast cancer resistance protein and cellular resistance to flavopiridol in acute leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2003 Aug 15;9(9):3320-8.

Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot.* 2005; 56, 421:2907-14.

Nielsen TO, West RB, Linn SC, Alter O, Knowling MA, O'Connell JX, Zhu S, Fero M, Sherlock G, Pollack JR, Brown PO, Botstein D, van de Rijn M: Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression study. *Lancet.* 2002; 359:1301-7.

O'Donnell KA, Yu D, Zeller KI, Kim JW, Racke F, Thomas-Tikhonenko A, Dang CV. Activation of transferrin receptor 1 by c-Myc enhances cellular proliferation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol.* 2006; 26, 6:2373-86.

O'Hare MJ, Ormerod MG, Monaghan P, Lane EB, Gusterson BA. Characterization in vitro of luminal and myoepithelial cells isolated from the human mammary gland by cell sorting. *Differentiation.* 1991; 46:209-21.

Orstavik S, Eide T, Collas P, Han IO, Taskén K, Kieff E, Jahnsen T, Skålhegg BS. Identification, cloning and characterization of a novel nuclear protein, HA95, homologous to A-kinase anchoring protein 95. *Biol Cell.* 2000; 92, 1:27-37.

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2004; 351, 27:2817-26.

Patocs A, Zhang L, Xu Y, Weber F, Caldes T, Mutter GL, Platzer P, Eng C: Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *N Engl J Med.* 2007; 357, 25:2543-51.

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

Pishvaian MJ, Feltes CM, Thompson P, Bussemakers MJ, Schalken JA, Byers SW. Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 1999; 59, 4:947-52.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29, 9:e45.

Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 313, 4:856-62.

Rishi AK, Zhang L, Yu Y, Jiang Y, Nautiyal J, Wali A, Fontana JA, Levi E, Majumdar AP. Cell cycle- and apoptosis-regulatory protein-1 is involved in

apoptosis signaling by epidermal growth factor receptor. J Biol Chem. 2006; 281, 19:13188-98.

Robinson TL, Sutherland IA, Sutherland J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. Vet Immunol Immunopathol. 2007; 115, 1-2:160-5.

Sacher M, Di Bacco A, Lunin VV, Ye Z, Wagner J, Gill G, Cygler M. The crystal structure of CREG, a secreted glycoprotein involved in cellular growth and differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102, 51:18326-31.

Sahai E. Illuminating the metastatic process. Nat Rev Cancer. 2007; 7: 737-49.

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

Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. J Biochem Biophys Methods. 2000; 46, 1-2:69-81.

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

Sherman CD, Hossfeld DK. Breast cancer. In: Hossfeld DK, Sherman CD, Lover RR, Bosch FX, editors. Manual of clinical oncology. Geneva (Switzerland): International Union Against Cancer; 1990. p. 253-71.

Singer CF, Gschwantler-Kaulich D, Fink-Retter A, Haas C, Hudelist G, Czerwenka K, Kubista E: Differential gene expression profile in breast cancer-derived stromal fibroblasts. Breast Cancer Res Treat. 2007.

Sloan EK, Anderson RL. Genes involved in breast cancer metastasis to bone. Cell Mol Life Sci. 2002; 59, 9:1491-502.

Sohara Y, Shimada H, Minkin C, Erdreich-Epstein A, Nolte JA, DeClerck YA. Bone marrow mesenchymal stem cells provide an alternate pathway of osteoclast activation and bone destruction by cancer cells. Cancer Res. 2005; 65, 4:1129-35.

Sommers CL, Gelmann EP, Kemler R, Cowin P, Byers SW. Alterations in beta-catenin phosphorylation and plakoglobin expression in human breast cancer cells. Cancer Res. 1994; 54, 13:3544-52.

Song H, Ki SH, Kim SG, Moon A. Activating transcription factor 2 mediates matrix metalloproteinase-2 transcriptional activation induced by p38 in breast epithelial cells. *Cancer Res.* 2006; 66, 21:10487-96.

Stamps AC, Davies SC, Burman J, O'Hare MJ. Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. *Int J Cancer.* 1994; 57:865-74.

Szabo A, Perou CM, Karaca M, Perreard L, Quackenbush JF, Bernard PS. Statistical modeling for selecting housekeeper genes. *Genome Biol.* 2004; 5, 8:R59.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3, 7:RESEARCH0034.

Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993; 9, 4:138-41.

Wada S, Noguchi T, Takeno S, Kawahara K. PIK3CA and TFRC located in 3q are new prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2006;13, 7:961-6.

Wang H, Yang GH, Bu H, Zhou Q, Guo LX, Wang SL, Ye L: Systematic analysis of the TGF-beta/Smad signalling pathway in the rhabdomyosarcoma cell line. *RD. Int J Exp Pathol.* 2003; 84:153-63.

Wang TN, Albo D, Tiszynski GP. Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloproteinase-9 production. *Surgery.* 2002; 132, 2: 220 -225.

Wang Y, Maciejewski BS, Weissmann G, Silbert O, Han H, Sanchez-Esteban J. DNA microarray reveals novel genes induced by mechanical forces in fetal lung type II epithelial cells. *Pediatr Res.* 2006; 60:118-24.

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

Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weiberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004; 117, 7:927-39.

Zayed MA, Yuan W, Leisner TM, Chalothorn D, McFadden AW, Schaller MD, Hartnett ME, Faber JE, Parise LV. CIB1 regulates endothelial cells and ischemia-induced pathological and adaptive angiogenesis. *Circ Res.* 2007;101, 11:1185-93.

APÊNDICE