Rosângela Portilho Costa Santos

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

Área de concentração: Oncologia

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo
Koike Folgueira**

**São Paulo
2006**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Rosângela Portilho Costa

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 / Rosângela Portilho Costa Santos. -- São Paulo, 2006.

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

Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira.

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

USP/FM/SBD-403/06

Dedicatória

A Deus,

por seu infinito amor.

*À todas as mulheres que convivem e lutam
corajosamente contra o câncer de mama.*

Ao meu amado esposo, Elson Mário, que com seu amor, carinho e companheirismo constantes sempre me incentivou nesta longa caminhada em busca de conhecimento.

À minha querida mãe, Maria José, e aos meus irmãos Rosimeire, João, Jackson e Jeferson, minha tão amada família, aqueles que desde bem cedo me ensinaram o sentido da palavra amor e que para sempre serão o meu porto seguro.

Aos meus tão queridos irmãos Nazaré e Daniel, por terem me acolhido em seu lar abençoado, cheio de amor, carinho e amizade, minha eterna gratidão.

Aos meus queridos tios Alba e Ademir e sua linda família, por todo o amor e carinho que sempre encontro em seus olhos.

Agradecimientos

À Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira, por sua orientação e imensa generosidade em compartilhar comigo o seu conhecimento. Por suas palavras de força e encorajamento nos momentos mais difíceis desta jornada.

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 de um sólido grupo de pesquisa em câncer de mama.

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

Aos amigos Ticiane Benvenuti, Cíntia Milani, Ana Paula Garey, Iran Amorim, Renata Sobral, Suzana Honda, Mateus Barros Filho e Leonardo Fonseca, Simone Costa e Paula Cravanzola, pelo carinho e ajuda em todas as etapas deste trabalho, tornando o nosso ambiente de trabalho mais prazeroso.

À Srta Márcia Batista Salzgeber, por sua simpatia e excelente colaboração nos ensaios de RT-PCR.

À Dra Patrícia Rozencham e Dra. Rosimeire Roela, por seus ensinamentos sobre cultura celular e contribuições em todas as etapas deste trabalho.

Ao 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 Frederico e a todos do seu grupo de pesquisa em câncer de cabeça e pescoço, por estarem sempre dispostos a ajudar em nosso convívio diário.

Aos amigos do Laboratório de adesão celular, companhias alegres e carinhosas que tornam o nosso ambiente de trabalho mais agradável.

À Dra. Dirce Maria Carraro e Srtas Jane Kaiano, Louise Danielle, Elen Bastos, Nádia Castro e a todos do Laboratório de Expressão gênica do Instituto Ludwig de São Paulo pela colaboração na realização dos ensaios de cDNA microarrays.

À Dra. Helena Brentani e seu grupo do Laboratório de Bioinformática do Instituto Ludwig de São Paulo pela realização das análises estatísticas dos dados de cDNA microarrays.

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

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

À Dra. Flávia Magone, por sua ajuda constante durante todo este trabalho e, como não poderia ser diferente, na formatação geral desta tese.

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

Ao Sr. Josué Moreira de Sousa, por sua simpatia e pelo maravilhoso cuidado com que realizou a formatação final desta tese.

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

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de uma bolsa de pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento deste projeto.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1. Introdução.....	1
2. Objetivos específicos	14
3. Métodos	16
3.1 Características das pacientes	17
3.2 Cultura de Células	20
3.2.1 Cultura de Células Epiteliais Mamárias	20
3.2.2 Cultura primária de fibroblastos obtidos de linfonodo axilar humano	21
3.2.3 Congelamento dos fibroblastos obtidos de linfonodo axilar humano	23
3.2.4 Obtenção do banco de congelamento de fibroblastos de linfonodos e de células epiteliais mamárias	23
3.2.5 Co-culturas de fibroblastos e células epiteliais	25
3.3 Recuperação das células após as co-culturas	25
3.4 Ensaio de Imunocitoquímica	26
3.5 Verificação da Proliferação Celular	27
3.6 Extração de RNA total	28
3.7 Tecnologia do cDNA microarray	29
3.8 Amplificação do RNAm.....	31
3.9 Hibridização em lâminas de vidro	35
3.10 Leitura e Normalização dos dados	37
3.11 Análise matemática dos dados.....	39
3.12 Análises de expressão gênica	41
3.13 RT-PCR EM TEMPO REAL	41
4. Resultados	46
4.1 Cultura primária de fibroblastos obtidos de linfonodo axilar humano ..	47
4.2 Caracterização Imunocitoquímica dos fibroblastos obtidos de linfonodo axilar humano	50
4.3 Proliferação dos Fibroblastos provenientes de linfonodo axilar humano	53
4.4 Co-culturas de fibroblastos de linfonodo e células epiteliais	54
4.5 Amostras de RNAs obtidos de Fibroblastos de linfonodos	57
4.6 Amplificação e Hibridização de RNAm das Células Epiteliais Mamárias e de Fibroblastos de Linfonodos	57

4.7	Perfil da expressão gênica diferencial de fibroblastos originários de linfonodos comprometidos por metástase de câncer de mama.	59
4.8	Perfil gênico de fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos ou não comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A) ou malignas (MDA-MB-231).	63
4.9	Perfil da expressão gênica de fibroblastos obtidos de linfonodos não comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A).....	66
4.10	Perfil da expressão gênica de fibroblastos obtidos de linfonodos não comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB-231).....	72
4.11	Perfil da expressão gênica de fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A).....	78
4.12	Perfil da expressão gênica de fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB-231).....	86
4.13	Perfil gênico de fibroblastos originários de linfonodos não comprometidos mantidos na presença de células epiteliais mamárias.	92
4.14	Perfil gênico de fibroblastos originários de linfonodos comprometidos mantidos na presença de células epiteliais mamárias.....	94
4.15	Genes modulados em fibroblastos originários de linfonodos após co-cultura com células epiteliais mamárias	96
4.16	Determinação por RT-PCR quantitativo da expressão de genes considerados diferencialmente expressos, em ensaios de cDNA microarrays, em fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos, mantidos isoladamente em cultura.	98
5.	Discussão	104
6.	Conclusões	132
7.	Anexos	134
8.	Referências	171

Lista de abreviaturas

µg	microgramas
µL	microlitros
µM	micromolar
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
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)
DEPC	dietilpirocarbonato
DMEM	meio Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos
DO	densidade ótica
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EGF	fator de crescimento epidermal
EMA	antígeno epitelial de membrana
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HGF	fator de crescimento de hepatócito
IGF	fator de crescimento de insulina
M	molar
mA	miliAmpere
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteinase da matriz extra celular
MOPS	ácido - 3-N morfolino propanesulfônico
NTPs	nucleotídeos tri-fosfato
PBSA	1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10mM Na ₂ HPO ₄ , azida, pH 7

PBS-EDTA	tampão de salina fosfato contendo 2 mM de ácido etilenodiamino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
Rnase A	ribonuclease A
RNA _{sin}	inibidor de RNA
rpm	rotações por minuto
RPMI	meio de cultura do Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ácido ribonucléico ribossomal
SDS	dodecil sulfato de sódio
SSC	0,15M NaCl; 0,015M citrato de sódio pH 7,0
TE	10mM Tris HCl, 1mM EDTA
TRITC	Isotiocianato de tetrametilrodamina cristalina
UV	luz ultravioleta

RESUMO

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*. São Paulo [Tese]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2006. 184p.

As interações epitélio-mesênquima podem influenciar o desenvolvimento do tumor no sítio primário e no linfonodo comprometido de pacientes com câncer de mama. Nosso objetivo foi avaliar a taxa de proliferação e perfil gênico de fibroblastos de linfonodos comprometidos e não comprometidos obtidos de pacientes com câncer de mama e determinar a influência de células epiteliais mamárias normais (MCF10A) ou malignas (MDA-MB-231) na expressão gênica destes fibroblastos. Foram estabelecidas culturas primárias de fibroblastos de linfonodos (3 comprometidos e 3 não comprometidos) de 6 diferentes pacientes com câncer de mama e não houve diferença na taxa de proliferação destes fibroblastos. Co-culturas de células MCF10A ou MDA-MB-231 com fibroblastos, separadas fisicamente por membranas porosas, foram realizadas por 72 horas. O RNA total dos fibroblastos foi extraído, amplificado e o perfil gênico foi analisado usando-se uma lâmina de cDNA microarray. Fibroblastos de linfonodos comprometidos e não comprometidos apresentaram perfil gênico similar, pois apenas 13 genes foram modulados, sendo que maior expressão de PGBD3 e PTBP2 em fibroblastos de linfonodos comprometidos foi confirmada em ensaios de RT-PCR em tempo real. Em fibroblastos, a co-cultura com células MCF10A alterou a expressão de maior número de genes que a co-cultura com células MDA-MB-231. Em fibroblastos originários de linfonodos não comprometidos mantidos em co-cultura com células MDA-MB-231 foram modulados 151 genes, em relação aos mesmos fibroblastos cultivados na ausência de células epiteliais, sendo que oito deles apresentaram variação de expressão superior a três vezes (BET1, ENTPD1, USP7, DAPK1, ERBB2 e NCF2). As células MDA-MB-231 modularam algumas vias de sinalização em fibroblastos não comprometidos, como vias do cálcio, insulina, hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e da regulação do citoesqueleto

de actina, mas o mesmo não ocorreu em fibroblastos de linfonodos comprometidos. Duzentos e quarenta e nove genes foram diferencialmente expressos em fibroblastos originários de linfonodos comprometidos mantidos em co-cultura com células MDA-MB-231 e quatro genes apresentaram variação superior a três vezes (ACLY, AXUD1, CLCN5 e PDE6D). Nestes fibroblastos, algumas funções biológicas foram reguladas apenas por influência da célula MDA-MB-231, entre as quais metabolismo de aminoácidos, excreção, transporte intra Golgi e regulação da forma celular. As vias de sinalização e funções biológicas reguladas em fibroblastos pela interação com células epiteliais malignas podem estar implicadas no desenvolvimento de metástases regionais no câncer de mama

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

Santos RPC. *Differential gene expression of fibroblasts from involved or uninvolved lymph nodes from breast cancer patients cultured alone or co-cultured with normal or malignant mammary epithelial cells*. [Thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 184p.

Tumor development may be influenced by epithelial-mesenchymal interactions in the primary site as well as in the involved lymph node from breast cancer patients. Our aim was to evaluate the proliferation rate and gene profile of fibroblasts obtained from involved and uninvolved lymph nodes from breast cancer patients and to determine the influence of normal (MCF10A) or malignant (MDA-MB-231) mammary epithelial cells on the gene expression of these fibroblasts. Primary culture from fibroblasts obtained from 3 involved and 3 uninvolved lymph nodes (ILF and NILF) from 6 different breast cancer patients was established and no difference in their proliferation rate was detected. These fibroblasts were co-cultured with MCF10A or MDA-MB-231 cells, physically separated by a porous membrane for 72 hours. Total RNA was extracted from the cells, amplified and the gene profile from fibroblasts cultured alone or with epithelial cells was analyzed by cDNA microarray slides. Fibroblasts from involved and uninvolved lymph nodes present a similar gene profile as only 13 genes were differentially expressed between them, including PGBD3 and PTBP2, which higher expression in fibroblasts from involved lymph nodes was confirmed by real time RT-PCR. In fibroblasts, more genes seem to be regulated upon co-cultured with MCF10A than with MDA-MB-231 cells. In fibroblasts from uninvolved lymph nodes co-cultured with MDA-MB-231 cells, 151 genes were modulated as compared with fibroblasts cultured alone, and eight of them, presented an expression variation superior to three times (BET1, ENTPD1, USP7, DAPK1, ERBB2 e NCF2). In these fibroblasts, MDA-MB-231 could modulate some signaling pathways as calcium, insulin, gonadotrophin releasing hormone (GnRH) and actin cytoskeleton regulation signaling pathways. Two hundred forty nine genes were differentially expressed by fibroblasts from involved lymph nodes co-cultured with MDA-MB-231 cells, four

of which with an expression variation superior to three times (ACLY, AXUD1, CLCN5 e PDE6D). In the last condition, fibroblasts had some biological functions regulated upon MDA-MB-231 cells influence, among which amino acid metabolism, excretion, intra-Golgi transport and regulation of cell shape. Signaling pathways and biological functions regulated in fibroblasts after interaction with malignant epithelial cells might be implicated in the development of regional metastasis in breast cancer.

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

1. Introdução

O câncer de mama é no mundo todo, incluindo o Brasil, um problema de saúde pública, sendo a primeira causa de morte por câncer nas mulheres em países desenvolvidos. No Brasil, o número de casos novos de câncer de mama esperados para 2006 é de 48.930, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde; INCA; 2006).

A alta mortalidade associada ao câncer de mama deve-se ao fato de que este pode invadir tecidos adjacentes, disseminar-se localmente para linfonodos e ainda por via hematogênica para órgãos à distância. A metástase representa a mais importante adversidade na progressão do carcinoma mamário, sendo que o acometimento linfonodal é considerado o mais confiável fator preditivo para um pior prognóstico, incluindo recidiva precoce e curto período de sobrevida.

A propensão de diversos tipos de cânceres a formar focos metastáticos em órgãos específicos é parcialmente explicada pela hipótese “A semente e o solo” na qual uma célula tumoral (*semente*) tem afinidade específica pelo microambiente de certos órgãos (*solo*), isto porque as metástases se formam somente quando a célula e o microambiente são compatíveis (Fidler, 2003; Soharraa *et al*, 2005). Células epiteliais neoplásicas coexistem no carcinoma com vários tipos de células estromais, que juntas criam o microambiente das células cancerosas. A contribuição do microambiente estromal para o desenvolvimento tumoral tem sido relatada em ensaios *in vitro* e em modelos de desenvolvimento de câncer em camundongos. O acúmulo de evidências indicam que células cancerosas

recrutam células estromais, como células inflamatórias, células vasculares e fibroblastos dentro do tumor, sendo este recrutamento essencial para a geração de um microambiente que alimenta ativamente o crescimento do tumor (Coussens & Werb, 2002; Bhowmick *et al.*, 2004; Elenbaas *et al.*, 2001; Cunha *et al.*, 2003; Olumi *et al.*, 1999; Tlsty *et al.*, 2001).

A formação do carcinoma desde seus estágios precoces parece depender da habilidade de células epiteliais transformadas em recrutar e subverter uma variedade de células estromais originárias do tecido normal adjacente. As dinâmicas interações estroma/epitélio em tumores sólidos podem ainda selecionar subgrupos de células estromais capazes de modular o comportamento tumoral e o microambiente local pode promover o surgimento de células estromais associadas ao tumor com diferentes funções do estroma normal. Assim, o componente estromal parece desenvolver-se conjuntamente com o compartimento epitelial tumoral (revisto por Elenbaas & Weinberg, 2001).

Alterações genéticas no estroma não mimetizam aquelas que ocorrem no epitélio, e elas podem ter um papel diferente e paralelo na carcinogênese e progressão tumoral, provavelmente pela modificação de algumas características específicas para a gênese do câncer (Fukino *et al.*, 2004).

Estudos recentes indicam que a habilidade da célula cancerosa para migrar e invadir, o que é um pré-requisito para a disseminação, pode ser regulada pela composição do ambiente extracelular. Os mecanismos pelos quais as interações célula/matriz extracelular influenciam o comportamento metastático de células tumorais são variados e incluem: alterações glicoproteicas da composição da matriz extracelular, que podem

alterar a adesão e a mobilidade celular; aumento da atividade de proteinases que degradam a matriz extracelular, que presumivelmente facilita a movimentação de células tumorigênicas por ruptura da membrana basal e do compartimento estromal; e liberação de fragmentos bioativos da matriz extracelular e/ou de fatores de crescimento que promovem a progressão tumoral (Bemis, Schedin, 2000).

Existem muitas barreiras para o entendimento da contribuição do estroma no fenótipo maligno do tumor. O estroma é complexo e consiste de componentes celulares, mecânicos e moleculares. Componentes celulares que influenciam uma célula tumoral incluem outras células epiteliais, fibroblastos, células inflamatórias e células endoteliais; cada uma das quais representam uma população heterogênea de fenótipos celulares. As moléculas específicas que são responsáveis pelas alterações induzidas pelo tumor no microambiente, assim como pelas recíprocas modificações do tumor por influência do microambiente, são desconhecidas, bem como as vias de sinalização intracelulares que resultam destas interações. A influência do estroma sobre as células tumorais, desde os estágios mais precoces da progressão tumoral, geram oportunidades para que células estromais normais tornem-se alvos para controlar o comportamento maligno de células geneticamente instáveis que rapidamente adquirem resistência às estratégias terapêuticas estabelecidas (Matrisian *et al.*, 2001).

O estroma constitui grande parte da neoplasia, apresentando grandes quantidades de matriz extracelular (MEC), fornecendo ao tumor uma consistência rígida (desmoplasia). O estroma fornece suprimento vascular e moléculas solúveis específicas da matriz extracelular necessárias para o

crescimento e a progressão tumoral. Este tecido conectivo é composto de colágenos intersticiais ou da membrana basal, fibronectina, laminina e várias proteoglicanas (revisto por Lin, Bissel, 1993). Sua população celular é heterogênea originária, principalmente, do mesênquima e inclui fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais, apresentando freqüentemente infiltração de células inflamatórias. A invasão estromal pelo tumor está associada com a expressão de uma variedade de fatores ligados à proliferação, motilidade celular e remodelação da matriz extracelular (Wiseman & Werb, 2002).

Em uma recente revisão da literatura sobre a importância dos fibroblastos no microambiente tumoral, Kalluri & Zeisberg (2006) relatam que os fibroblastos induzem a formação de um microambiente de matriz extracelular alterado através do aumento na deposição de colágenos tipo I e III e da expressão de tenascina C, levando a uma aceleração da progressão do câncer. Estes fibroblastos também seriam responsáveis por intermediarem a resposta inflamatória, secretando quimiocinas e interleucinas. Estas células podem ainda interagir com a microvasculatura através da secreção de metaloproteases e fatores de crescimento como o VEGF, TGF β e HGF, que por sua vez, influenciam o epitélio adjacente. Podem também estimular a proliferação e invasão de células cancerosas pela secreção de fatores de crescimento, como TGF β e SDF1 (Fator 1 derivado de célula estromal) (Figura I).

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) constituem uma família de proteases responsáveis pelo remodelamento normal da matriz extracelular, alvo de estudos no desenvolvimento do câncer, pois podem interferir na capacidade de invasão da célula tumoral. Estas proteínas

são sintetizadas tanto pelas células epiteliais tumorais quanto pelos fibroblastos, células endoteliais e inflamatórias (Menashi *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2003). Em carcinomas mamários, assim como em muitos outros tipos de tumores, a expressão gênica da estromelisina-3 (MMP-11) mostrou-se restrita às células fibroblásticas vizinhas às células neoplásicas (Basset *et al.*, 1990), isto não foi verificado nas próprias células malignas ou em células estromais em sítios distantes do foco tumoral (Rouyer *et al.*, 1994). Wang *et al.*, 2002, relataram que a expressão de estromelisina-3 é induzida apenas após contato com células cancerígenas, sugerindo que a célula cancerosa influencia o comportamento dos fibroblastos. Em outro trabalho, no qual determinou-se a expressão gênica de MMP-2 e gelatinase B (MMP-9) após co-cultura de fibroblastos derivados de tumor de mama e células epiteliais mamárias, relata-se que a expressão de MMP-2 está presente no estroma de tumores malignos e é aumentada através de estimulação parácrina, mediada por fatores solúveis. Por outro lado, a expressão de MMP-9 em fibroblastos derivados de tumores mamários requer contato direto com epitélio tumoral maligno (Singer *et al.*, 2002). Ainda mostrando a importância da interação célula epitelial/estroma para o comportamento tumoral, Bisson e colaboradores (2003) relataram que apenas fibroblastos derivados de tumor de mama mostram expressão elevada de metaloproteinase de matriz tipo I de membrana (MT1-MMP), em relação a fibroblastos derivados de mama normal. Portanto a interação célula epitelial/estromal interfere na expressão de MMPs.

Outra via importante no desenvolvimento do câncer de mama é a do TGF- β (Fator de crescimento transformante β). A família do TGF- β age como inibidora de proliferação na maior parte das células epiteliais. Relata-se que

células carcinogênicas apresentam altos níveis de TGF- β relacionados com a desmoplasia do tumor. Em câncer de mama, TGF- β 1 é preferencialmente expresso em tumores primários avançados e em metástases de linfonodos, sugerindo seu papel na interação entre as células tumorais e o estroma adjacente. Entretanto, durante a progressão tumoral, as células epiteliais tumorais geralmente adquirem mutações em componentes da via do TGF- β , como os receptores de TGF- β tipo I e II e nas Smads 2 e 4, ou ainda em componentes da via do retinoblastoma (pRB). Estas mutações conferem às células tumorais resistência aos efeitos inibitórios de crescimento do TGF- β em diferentes graus. No entanto, a perda de sensibilidade ao TGF- β é freqüentemente acompanhada por aumento da expressão de TGF- β , sendo uma de suas fontes os fibroblastos estromais (Gold *et al.*, 1999). Estudos recentes demonstraram que, em camundongos, nos quais o gene do receptor de TGF- β tipo II foi inativado em fibroblastos estromais, houve a superexpressão de fator de crescimento de hepatócito (HGF), levando a um aumento na proliferação de células epiteliais que expressavam o receptor de HGF, c-met, em ação parácrina (Bhowmick *et al.*, 2004).

Figura I: Funções dos fibroblastos ativados no estroma tumoral. Fibroblastos interagem com células cancerosas, células epiteliais adjacentes, células endoteliais, pericitos e células inflamatórias, através da secreção de fatores de crescimento, colágenos, quimiocinas, interleucinas e metaloproteases da matriz (Kalluri & Zeisberg., *Nature Reviews Cancer*, 2006).

Um melhor entendimento sobre a influência dos componentes estromais no comportamento tumoral requer sistemas modelos em que uma única variável possa ser manipulada e avaliada. Aspectos celulares, moleculares e mecânicos do estroma podem ser estudados em sistemas que sejam simples o bastante para serem entendidos, todavia complexos o suficiente para mimetizar o câncer humano. Ocorreram avanços significantes em modelos genéticos de camundongos, mas existem muitas dificuldades na manipulação do componente estromal nestes modelos. Estudos *in vitro* são

complicados por implicarem na alteração da ação e da expressão gênica quando as células são removidas do seu ambiente original, no entanto modelos *in vitro* continuam sendo ferramentas imprescindíveis para o melhor entendimento das dinâmicas interações que ocorrem no microambiente tumoral (revisto por Matrisian *et al.*, 2001).

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

Além disso, de modo geral, estes trabalhos sugerem que fibroblastos oriundos de tecido normal tendem a reduzir a proliferação de células epiteliais, ao contrário de fibroblastos originários de tumor, que tendem a induzir a proliferação das células epiteliais.

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

Outra hipótese é que os fibroblastos promovam a invasão das células do carcinoma de mama. Baseado neste conceito, Wang *et al.*, (2002) utilizando fibroblastos obtidos da pele em co-cultura com células epiteliais malignas MDA-MB-231 mostraram um aumento da capacidade de invasão dessas últimas associada à produção de MMP-9, metaloprotease associada ao fenótipo invasivo.

Em outro modelo de co-culturas observou-se que somente algumas linhagens de câncer mamário têm a capacidade de invadir o esferóide de

fibroblastos, fossem eles originados da pele ou do tumor. Além disso, demonstrou-se que fibroblastos obtidos de tumor apresentam características de miofibroblastos. Por outro lado, observou-se também que fibroblastos normais co-cultivados com células epiteliais tumorais, apresentam menor expressão de RNAm de PMP22, que codifica uma proteína cuja expressão em fibroblastos correlaciona-se a parada de proliferação em G0, com papel potencial na interação heteróloga entre células tumorais e fibroblastos normais (Kunz-Shughart *et al.*, 2001).

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

Portanto, modelos *in vitro* e *in vivo* indicam que os fibroblastos influenciam a proliferação e invasão das células tumorais. Alguns autores avaliaram este aspecto no sítio do tumor primário, poucos abordaram esta interação nos linfonodos. Moléculas específicas, bem como vias de

sinalizações intracelulares são pouco conhecidas e é possível que esta interação favoreça o desenvolvimento tumoral.

Os linfonodos são órgãos encapsulados constituídos por tecido linfóide e que aparecem espalhados pelo corpo, sempre no trajeto de vasos linfáticos. Os linfonodos são filtros da linfa. A linfa, antes de atingir a corrente sanguínea, passa pelos linfonodos satélites e regionais. 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 células que compõem o microambiente linfonodal podem exercer influência no perfil da expressão gênica das células cancerosas que o comprometem, por sua vez, induzindo ou inibindo o desenvolvimento da metástase regional (Hasebe *et al.*, 2000).

As células estromais presentes em linfonodo também devem representar um papel significativo durante o processo de disseminação regional da doença. Um dos poucos trabalhos que abordaram esta situação foi o de LeBedis *et al.* (2002) que realizaram cultura de células estromais originárias de linfonodo de rato e observaram que o meio condicionado obtido causa um aumento na proliferação de linhagens celulares de câncer de mama mas, não de células epiteliais mamárias normais. Além do mais, detectaram que estas células estromais apresentavam transcritos de vários fatores de crescimento como IGF-I, EGF, HGF e PDGF- α . Portanto, pouco se sabe a cerca da influência dos fibroblastos no fenótipo das células epiteliais tumorais e vice-versa, isto é, das células tumorais nos fibroblastos.

Neste contexto, o papel dos fibroblastos no crescimento e progressão tumoral ainda é controverso, principalmente nos sítios metastáticos. Logo, nosso primeiro objetivo foi analisar o fenótipo de fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos e não comprometidos de pacientes com câncer de mama

Além disso, a interação entre células malignas e fibroblastos pode acontecer de diversas maneiras, inclusive por meio de fatores solúveis produzidos pelas células. Portanto, nosso outro objetivo foi avaliar a influência da interação epitélio-mesênquima na expressão gênica de fibroblastos de linfonodos de pacientes com câncer de mama.

2. Objetivos específicos

1. Estabelecer culturas primárias de fibroblastos provenientes de linfonodos comprometidos e não comprometidos de pacientes com câncer de mama e avaliar a taxa de proliferação destas células.
2. Determinar os genes diferencialmente expressos entre fibroblastos provenientes de linfonodos comprometidos ou não comprometidos.
3. Realizar co-culturas de fibroblastos provenientes de linfonodos comprometidos ou não comprometidos com células epiteliais mamárias normais MCF10A e malignas MDA-MB-231.
4. Determinar a influência de fatores solúveis derivados de células epiteliais mamárias na expressão gênica de fibroblastos de linfonodos.

3. Métodos

3.1 Características das pacientes

Este é um estudo prospectivo 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 recrutadas 10 pacientes com diagnóstico de câncer de mama que receberam tratamento no IBCC. Foram coletadas as amostras de linfonodo axilar das pacientes submetidas à mastectomia ou ressecção conservadora, acompanhadas de linfadenectomia, após a obtenção do consentimento livre e esclarecido das mesmas. Estas amostras foram coletadas pelo Dr. Eduardo Carneiro de Lyra, mastologista do IBCC, durante o período de dezembro de 2002 a março de 2004.

Foram incluídas seis pacientes com carcinoma ductal invasivo e quatro pacientes com carcinoma lobular invasivo, que tiveram os seus diagnósticos confirmados por exames histopatológicos, os quais foram realizados tanto em amostras de tumor primário quanto nas respectivas amostras de linfonodos. As amostras de linfonodos incluídas neste estudo foram apenas aquelas em que histopatologia confirmou serem comprometidos ou não comprometidos. O

estadiamento clínico destas pacientes foi realizado baseando-se no sistema TNM, adotado pela “American Joint Committee on Cancer”, AJCC, 5ª edição, 1997.

Todas as pacientes recrutadas eram do sexo feminino com idade de 40 a 74 anos. A idade mediana das pacientes foi de 45,5 anos e não houve diferença significativa na média de idade das pacientes com linfonodos comprometidos ou não comprometidos. Não houve diferença significativa na histologia do tumor e expressão de receptores de estrógeno e ErbB2 das pacientes com linfonodos comprometidos ou não comprometidos. Todos os tumores foram positivos para receptores hormonais (ER e/ou PR), sendo que ER foi expresso em quatro e dois tumores de pacientes com linfonodos não comprometidos e comprometidos, respectivamente. ErbB2 foi expresso em dois tumores de pacientes com linfonodos comprometidos. Foram dissecados pelo menos 13 linfonodos axilares de cada paciente (Tabela 1).

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

Amostra	Idade	T N M	LN	Tumor Primário	Número de Linfonodos comprometidos	ER	PR	ErbB2
A	43	T2N0M0	-	Ca lobular invasivo	0/13	+	+	-
B	44	T2N0M0	-	Ca lobular invasivo	0/29	+	+	-
C	74	T1N0M0	-	Ca ductal invasivo	0/28	+	+	-
D	42	T3N0M0	-	Ca ductal invasivo	0/22	+	+	-
E	60	T2N0M0	-	Ca lobular invasivo	0/27	-	+	-
F	40	T2N1M0	+	Ca ductal invasivo	2/19	+	+	-
G	47	T2N1M0	+	Ca ductal invasivo	3/19	-	+	+
H	49	T1N2M0	+	Ca ductal invasivo	6/25	+	+	+
I	59	T2N3M0	+	Ca lobular invasivo	13/27	-	+	-
J	41	T2N3M0	+	Ca ductal invasivo	10/19	-	+	-

Para a realização dos ensaios de co-cultura e de microarrays foram selecionados os fibroblastos provenientes de cultura primária de 6 amostras de linfonodos axilares de pacientes com câncer de mama, sendo que 3 amostras eram de linfonodos comprometidos e 3 amostras de linfonodos não comprometidos, estes últimos provenientes de pacientes das quais todos os linfonodos dissecados foram considerados negativos ao exame histopatológico. A idade mediana destas pacientes com linfonodos não comprometidos foi de 44 anos, variando de 43 a 74 anos e a idade mediana daquelas pacientes com linfonodos comprometidos foi de 49 anos, variando de 41 a 59 anos. Não houve diferença significativa na média de idade destas pacientes cujas amostras de linfonodos foram utilizadas para a cultura primária dos fibroblastos usados nos ensaios de co-cultura e de microarrays ($p=0,744$). As amostras incluídas para estes ensaios estão descritas na Tabela 02.

Tabela 2- Dados sobre as amostras de fibroblastos obtidos de linfonodo axilar humano usadas para os ensaios de co-culturas e microarrays. Ca – Carcinoma; LN - Linfonodo; - Linfonodo negativo; + Linfonodo positivo

Amostra	T N M	LN	Tumor Primário	Número de Linfonodos comprometidos
A	T2N0M0	-	Ca lobular invasivo	0/13
B	T2N0M0	-	Ca lobular invasivo	0/29
C	T1N0M0	-	Ca ductal invasivo	0/28
H	T1N2M0	+	Ca ductal invasivo	6/25
I	T2N3M0	+	Ca lobular invasivo	13/27
J	T2N3M0	+	Ca ductal invasivo	10/19

3.2 Cultura de Células

3.2.1 Cultura de Células Epiteliais Mamárias

As células epiteliais mamárias humanas normais HB4A 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. As células HB4A foram, então, imortalizadas pela transfecção do gene de antígeno T grande de vírus SV40 (O'Hare *et al.*, 1991; Stamps *et al.*, 1994). Estas células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA), suplementado com 10 % de soro fetal bovino, inativado por calor (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA), 5 µg/ml de insulina bovina (Sigma), 5 µg/ml µg/ml de hidrocortisona (Sigma).

As células epiteliais mamárias humanas normais MCF-10A e as células epiteliais de câncer de mama com potencial metastático MDA-MB 231 foram adquiridas da ATCC (American Type Culture Collection). As células MCF10A foram cultivadas em meio de cultura Ham's F-12 (Cultilab) com Dulbecco's (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA) na proporção de 1:1, suplementado com 5% de soro de cavalo (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA), 20 ng/ml de fator de crescimento epidermal (EGF) (SIGMA-ALDRICH Corporation, Saint Louis,US)., 100 ng/ml de toxina colérica (Calbiochem), 0,01 mg/ml de insulina bovina (SIGMA-ALDRICH Corporation, Saint Louis,US). e 500 ng/ml de hidrocortisona (SIGMA-ALDRICH Corporation, Saint Louis,US).

As células epiteliais humanas de câncer de mama, MDA-MB 231 foram cultivadas em meio de cultura Leibovitz L-15 (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA). As células epiteliais mamárias humanas normais, MCF-10A foram cultivadas em meio de cultura Ham's F-12 (Cultilab) com Dulbecco's (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA) na proporção de 1:1, suplementado com 5% de soro de cavalo (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA), 20 ng/ml de fator de crescimento epidermal (EGF) (Sigma), 100 ng/ml de toxina colérica (Calbiochem), 0,01 mg/ml de insulina bovina (Sigma) e 500 ng/ml de hidrocortisona (Sigma).

Todas as culturas celulares foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific, Arietta, Ohio, EUA).

3.2.2 Cultura primária de fibroblastos obtidos de linfonodo axilar humano

A cultura primária de fibroblastos foi estabelecida a partir do método de explantes usando-se tecido linfonodal. Amostras de linfonodo axilar humano comprometido pelo câncer ou livre da doença foram seccionadas em pequenos fragmentos e estes foram distribuídos, mantendo-se certa distância entre os mesmos, sobre a superfície de garrafas de cultura com 25 cm² de área (Corning Incorporated, NY, USA). A cada garrafa foi acrescentado 2,5 ml de meio DMEM (Dulbecco's) suplementado com soro fetal bovino 20% (FBS), 100 µg/ml de ampicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 2,5 µg/ml de anfotericina B. As células foram mantidas em estufa a 37°C e em atmosfera constante de 5% de CO₂, sendo o meio trocado a cada 5 dias. Os explantes foram retirados, em média, na terceira semana, e quando os fibroblastos atingiram a confluência, geralmente na quarta semana, foram tripsinizados usando-se 1ml de Tripsina-

EDTA 1x (GIBCO, Carlsbad, Califórnia), que foi inativada com 5 ml de DMEM contendo 10% de FBS. As células em suspensão foram centrifugadas a 2000 RPM por 2 minutos e o botão de células ressuspendido em 2 ml de DMEM para a contagem e verificação da viabilidade celular pelo método de exclusão de azul tripan (0,02%). Um total de 1×10^6 células foram semeadas em garrafas de 75 cm² de área (Corning Incorporated, NY, USA) usando um volume de 10 ml de DMEM (Dulbecco's) suplementado com soro fetal bovino 10% (FBS), antibióticos e fungicida, como citado anteriormente. Os fibroblastos desta garrafa foram considerados em primeira passagem (passagem 1) , e a cada nova tripsinização este número aumentou sucessivamente.

Para a realização dos ensaios de co-cultura com as células epiteliais MCF10A e MDA-MB-231 e para as análises de expressão gênica diferencial por microarrays, estes fibroblastos a partir da segunda passagem foram cultivados em meio de cultura Ham's F-12 (Cultilab) com Dulbecco's (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA) na proporção de 1:1, suplementado com 5% de soro de cavalo (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA), 20 ng/ml de fator de crescimento epidermal (EGF) (SIGMA-ALDRICH Corporation, Saint Louis,US), 100 ng/ml de toxina colérica (Calbiochem), 0,01 mg/ml de insulina bovina (SIGMA-ALDRICH Corporation, Saint Louis,US). e 500 ng/ml de hidrocortisona (SIGMA-ALDRICH Corporation, Saint Louis,US), isto é, o mesmo meio de cultura utilizado para o cultivo das células epiteliais.

Os fibroblastos usados nos ensaios de co-cultura e microarrays foram somente aqueles que se encontravam entre a quarta e a décima passagem em cultura.

3.2.3 Congelamento dos fibroblastos obtidos de linfonodo axilar humano

Após o estabelecimento de uma cultura homogênea de fibroblastos obtidos de linfonodo axilar humano, a partir da terceira passagem, iniciamos a montagem de um banco de congelamento para estas células. Foi realizada a contagem e verificação da viabilidade celular destes fibroblastos pelo método de exclusão de azul tripan (0,02%) e um total de 1×10^6 células, com viabilidade acima de 95%, foram congeladas usando-se a seguinte solução para cada ampola de 2ml: 95% de soro fetal bovino e 5% de DMSO (Dimetilsulfóxido, SIGMA, Saint Louis, USA). 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.

3.2.4 Obtenção do banco de congelamento de fibroblastos de linfonodos e de células epiteliais mamárias

As culturas primárias de fibroblastos e as linhagens de células epiteliais mamárias, que foram adquiridas da ATCC, foram expandidas para a realização subsequente de todos os ensaios. Em paralelo, também foi montado um banco de congelamento dos fibroblastos obtidos de todas as amostras de linfonodos coletadas, assim como das células epiteliais mamárias. Imagens das células epiteliais MCF10A, MDA-MB-231 e HB4A podem ser visualizadas na sequência de figuras a seguir (Figuras 1, 2 e 3).

Figura 1: Células epiteliais mamárias MCF-10A em cultura (aumento 100X)

Figura 2: Células epiteliais mamárias MDA MB 231 em cultura (aumento 100X)

Figura 3: Células epiteliais mamárias HB4A, em cultura (aumento 100X)

3.2.5 Co-culturas de fibroblastos e células epiteliais

Para a realização dos ensaios de co-cultura as células epiteliais foram semeadas em placas de 6 poços com 9,6 cm² de área/poço (Becton Dickinson Labware, USA). Foram plaqueadas $1,34 \times 10^5$ células epiteliais na superfície de cada poço (8×10^5 células epiteliais por placa), usando-se 3 mL de DMEM (Dulbecco's) / Ham's F-12 (Cultilab), na proporção de 1:1, suplementado com soro de cavalo 5% (Gibco BRL, 'Gaithersburg, EUA), 20 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF) (Sigma), 100 ng/mL de toxina colérica (Calbiochem), 0,01 mg/mL de insulina bovina (Sigma) e 500 ng/mL de hidrocortisona (Sigma), 100 µg/mL de ampicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Passadas 24 horas do plaqueamento inicial das células epiteliais, foram colocados, dentro de cada poço, insertos com membranas de 4,2 cm² de área e poros de 0,4 µm (Becton Dickinson Labware, USA). Sobre a membrana destes insertos foram semeados os fibroblastos, numa proporção de 30% em relação ao número inicial de células epiteliais, usando-se 2,5 mL do mesmo meio enriquecido que foi utilizado para o plaqueamento das células epiteliais. As co-culturas foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera constante de 5% de CO₂ por um período de 72 horas.

3.3 Recuperação das células após as co-culturas

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

(Corning Incorporated, NY, USA) e TRIZOL[®] (Life Technologies, Inc.). Inicialmente, acrescentou-se 200µl do reagente a cada um dos insertos contendo os fibroblastos, assim como aos poços da placa contendo as células epiteliais. 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.

3.4 Ensaio de Imunocitoquímica

Para a caracterização imunocitoquímica dos fibroblastos obtidos de linfonodo axilar humano foi feito o semeamento dos mesmos sobre lamínulas de vidro com 0,13 cm² de área (Kittel Gläser, Germany) numa densidade de 1×10^5 células usando-se, em cada lamínula, 1ml de meio DMEM (Dulbecco's) suplementado com soro fetal bovino 10% (FBS), 100 µg/ml de ampicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 2,5 µg/ml de anfotericina B. Estas lamínulas haviam sido previamente colocadas dentro de poços de placas de 24 poços com 2 cm² de área (Nunc, Dinamarca). A placa foi mantida por 48 horas em estufa a 37°C e atmosfera constante de CO₂. Para a reação imunocitoquímica, os fibroblastos, aderidos às lamínulas, foram fixados e permeabilizados a temperatura ambiente com o uso de acetona 70% por 5 minutos, lavados 3 vezes (10 minutos cada lavagem) com 200µl de PBS-BSA 0,2% e incubados por 30 minutos com 200µl de PBS-BSA 2%. Após a titulação com 4 diferentes concentrações do anticorpo primário, as reações foram realizadas a temperatura ambiente, como descrito a

seguir, utilizando-se os seguintes anticorpos primários: anticorpo monoclonal anti-vimentina humana gerado em camundongo, clone Vim 3b4 (1:200) (DAKO Corporation, Carpinteria, USA); anticorpo monoclonal anti-citoqueratina humana gerado em camundongo, clones AE1/AE3 (1:100) (DAKO Corporation, Carpinteria, USA); anticorpo monoclonal anti-actina de músculo liso humana gerado em camundongo, clone M0635 (1:200) (DAKO Corporation, Carpinteria, USA). Usou-se 150µl de cada anticorpo diluído e um período de incubação de 1 hora para a reação. Também foi feito um controle negativo da reação na qual utilizamos somente o anticorpo secundário. Após a incubação com o anticorpo primário, as lamínulas foram lavadas 3 vezes (10 minutos cada lavagem) com PBS-BSA 0,2% e posteriormente incubadas no escuro com o anticorpo secundário gerado em cabra contra IgG de camundongo conjugado a TRITC (Isotiocianato de Tetrametil Rodamina Cristalina), clone T7782 (1:100) (SIGMA-ALDRICH Corporation, Saint Louis,US). Após esta incubação as lamínulas foram novamente lavadas 3 vezes (10 minutos cada lavagem) com 200µl de PBS-BSA 0,2% e, finalmente, foi realizada a montagem das lamínulas sobre lâminas de vidro com o uso de uma gotícula de glicerol. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência NIKON Eclipse E600 (Japão) e as imagens capturadas em câmera digital NIKON E4500 (NIKON, Japão).

3.5 Verificação da Proliferação Celular

A quantificação da proliferação dos fibroblastos foi realizada usando-se o kit Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Applied Science, Germany) que se baseia na clivagem do sal tetrazólio WST-1 em formazan pela enzima

succinato-tetrazólio reductase, membro da cadeia respiratória da mitocôndria e ativa apenas em células viáveis.

Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade inicial de 3×10^3 células/poço e incubadas com uma solução de WST-1 por aproximadamente 4 horas. Após este período de incubação, formaram-se cristais azuis de formazan e a absorbância desta coloração foi medida através de um espectofotômetro (leitor de ELISA). A absorbância obtida foi correlacionada com o número de células usando-se o programa GraphPad Prism®, versão 3.0 (GraphPad Software).

3.6 Extração de RNA total

Para extração do RNA total, as células foram colocadas em tubos contendo solução TRIZOL[®] (Life Technologies; uma solução monofásica de fenol e isoticianato de guanidina). O RNA foi extraído conforme instruções do fabricante e dissolvido em H₂O tratada com DEPC. A concentração foi determinada através da leitura da absorbância a 260 e 280nm. Para avaliar a qualidade do RNA extraído, todas as amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose sob condições desnaturantes. A verificação da integridade do RNA foi feita avaliando-se a relação entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 18 e 28S.

3. 7 Tecnologia do cDNA microarray

As lâminas de *cDNA microarray* 4.8K002 foram contruídas no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, sob a coordenação do Dr. Luiz Fernando Lima Reis, e são constituídas de 4.800 sequências imobilizadas sendo que 4.608 correspondem a clones de ORESTES (“open reading frame expressed sequence tags”) que representam genes humanos e que respeitam os seguintes critérios para inclusão: i) Clones de genes de sequências completas (*full length*); ii) Clone com tamanho maior que 300 pares de bases com sequência de alta qualidade (conteúdo de CG); iii) Clone que quando pesquisado no site: <http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast> resultou em gene com identidade > que 85% em 100 pb; e iv) Clone com sequência mais 3'. Dentre os 4.608 genes diferentes, 85,2% destes genes apresentam classificação ontológica em processos biológicos, função molecular ou componente celular (Al-Shahrour *et al.*, 2004). Foram incluídos nesta lâmina 192 sequências expressas consideradas controles positivos e não expressas consideradas controles negativos. Dentre os genes que apresentam função conhecida, foram categorizadas 505 classes funcionais distintas, que se distribuem em sua maioria dentro dos seguintes grupos funcionais: regulação de transcrição dependente de DNA, fosforilação de proteínas e aminoácidos, proteólise e peptidólise, processos biológicos desconhecidos, transporte de elétrons, transporte, transdução de sinal mediada por GTPase, crescimento celular ou manutenção, transporte de proteínas intracelulares, transdução de sinal, adesão celular, desenvolvimento, biossíntese de proteínas, ciclo da ubiquitina, metabolismo, regulação negativa da proliferação celular, transcrição, ciclo

celular, entre outras. 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 seqüências expressas (expressed sequence tags, ESTs) incluídas no estudo foram amplificadas por reação de polimerase em cadeia (PCR) onde foram usados 0,1 mM dos iniciadores universais senso e anti-senso do fago M13; 0,025 unidades de TAQ DNA-polimerase; 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP); 10 µL de tampão de PCR 10X e 2µL da suspensão contendo o clone bacteriano, em um volume final de 100 µL de reação. As reações foram incubadas no aparelho Gene Amp (Perkin Elmer, EUA) sob as seguintes condições: 1 ciclo: 95 °C por 5 min seguido de 35 ciclos: 94 °C por 20 seg, 55 °C por 20 seg, 72 °C por 40 seg e um último ciclo de extensão a 72 °C por 5 min.

Os produtos de PCR foram fracionados em gel de agarose 1%, o qual foi corado com brometo de etídio, a fim de verificar a presença de amplificações inespecíficas. No passo seguinte os produtos foram purificados utilizando-se o produto “*QIAquick 96 PCR Purification*” (Quiagen, Alemanha) e sequenciados para confirmar a identidade dos genes. A seguir estes produtos foram fixados em lâminas de vidro utilizando o robô Flexys (Genomic Solutions, Reino Unido). Foram dispensados 50-75 nL de suspensão contendo o inserto, correspondendo, aproximadamente a 10 pg de DNA em cada ponto. Após a deposição, a fixação do cDNA deu-se em luz ultravioleta a 90 µJ/cm² (UV cross linker, Stratagene, EUA), seguida de incubação a 80°C durante 2 a 4h. As lâminas foram estocadas em dissecador sob vácuo.

3.8 Amplificação do RNAm

O protocolo de amplificação do RNAm baseia-se em Wang e colaboradores (2000) e foram realizadas modificações visando um melhor resultado (Esquema 1 e 2). Partiu-se de 3 a 5 μg de RNA total do material que se desejava amplificar, diluído em 6 μL de H_2O DEPC (Merck, Germany) contendo 1 μL (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) do primer oligo dT (15)-T7 (5' AAA CGA CGG GCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC 3') e 2 μL de dNTP 10mM. O RNA total foi desnaturado a 70°C por 10 minutos e o anelamento do primer ocorreu enquanto a reação atingia a temperatura ambiente, por 15 minutos. O promotor do fago bacteriano T7 foi incorporado na síntese de cDNA pela reação de transcrição reversa (RT) por adição de 4 μL de "first-strand buffer" 5X (Invitrogen, USA), 2 μL dithiotreitol 0,1 M (DTT; Invitrogen), 1 μL RNasin (Promega, Madison, WI), 2 μL (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) TS (template switch) primer (5' AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG 3'), essa reação foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguida de 42°C por 05 minutos e após este tempo, adicionou-se 2 μL da enzima "Superscript II reverse transcriptase" (Invitrogen). A síntese de cDNA foi completada por 2 horas a 42°C seguida de desnaturação a 70°C por 15 minutos.

A segunda fita de DNA foi sintetizada por adição, na reação anterior, de 106 μL de H_2O DEPC, 15 μL de "Advantage PCR buffer" (Clontech, Palo Alto, CA), 3 μL dNTP 10 mM, 1 μL RNase-H (Promega, Madison, WI) e 5 μL de "Advantage cDNA Polymerase" (Clontech). No termociclador os seguintes ciclos de temperatura foram utilizados: 37°C por 20 minutos para digestão do

mRNA, 94°C por 3 minutos para desnaturação do cDNA, 65°C por 3 minutos para anelamento específico do primer TS e 75°C por 30 minutos para a extensão final. O cDNA dupla fita foi purificado por adição de 150 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), inversão por 20 segundos e centrifugação 14000 x g por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual adicionou-se 70 µL de acetato de sódio 3M e 500 µL de etanol absoluto. Este material foi então precipitado por centrifugação a 14000 x g por 20 minutos a temperatura ambiente e lavado 2 vezes com etanol 70%, sendo cada centrifugação foi de 14000 x rpm por 2 minutos. As amostras secaram a temperatura ambiente por aproximadamente 40 minutos, foram ressuspensas em 20 µL de H₂O DEPC e guardadas em freezer a -20°C para a próxima etapa.

Para a reação de transcrição *in vitro* utilizou-se o kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems-SP6, T3, T7 (Promega). Adicionou-se à solução de 20 µL de cDNA dupla fita 10 µL de tampão de reação, 15 µL rNTP 25 mM e 5 µL do mix da enzima de transcrição T7 RNA Polimerase. Essa reação foi incubada por 6 horas a 37°C. O RNA amplificado (aRNA) foi purificado e o cDNA dupla fita removido pelo método de TRIZOL® (Life Technologies). A concentração foi determinada por leitura da absorbância a 260 e 280 nm (GeneQuant, Clamart Cedex, France).

Para a segunda etapa de amplificação de mRNA, partiu-se de 1 a 5 µg do aRNA (RNA amplificado) anterior em 7 µL de volume. Quando necessário, as amostras foram concentradas em Speed Vac (Speed Vac Concentrator, Savant). Adicionou-se 3 µL (2µg/µL) de random hexamer primer (dN6;

AmershamPharmaciaBiotech, UK). A síntese de cDNA foi realizada adicionando-se 5 μ L do “first-strand buffer” 5X (Invitrogen), 2 μ L dithiotreitol 0,1 M (DTT; Invitrogen), 2 μ L dNTP 10 mM e 1 μ L RNasin (Promega, Madison, WI). A reação foi incubada por 10 minutos a 65° C seguida do acréscimo de 2 μ L de “Superscript II reverse transcriptase” (Invitrogen). Essa reação foi incubada por 2 horas a 42°C e ao final desta incubação, adicionou-se 1 μ l de RNase H que agiu por 20 minutos a 37° C. Para a síntese da segunda fita de cDNA utilizou-se o primer oligo dT (15)-T7 com o sítio promotor do fago bacteriano T7 e os reagentes descritos no protocolo da primeira etapa de amplificação. As etapas de purificação de cDNA dupla fita, transcrição *in vitro* e purificação com TRIZOL[®] também seguiram o mesmo protocolo anterior.

Esquema 01: Esquema da primeira etapa de amplificação do mRNA.

Esquema 02: Esquema da segunda etapa de amplificação de mRNA.

3.9 Hibridização em lâminas de vidro

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.

As lâminas de cDNA microarray foram pré-hibridizadas a 42°C durante oito horas em tubo cônico contendo 5X SSC; 0,2% SDS; 1% BSA; 5X solução de Denhardt's (filtrada em membrana de poro 0,22 ou 0,45µm). A seguir as lâminas foram lavadas em água destilada e montadas imediatamente na estação de hibridização GeneTac 2000 (Genomic Solutions, Reino Unido) para receber a sonda de cDNA a ser hibridizada.

Cada amostra foi hibridizada em duplicata utilizando-se o sistema inverso de incorporação de nucleotídeos conjugados a fluorocromos cy3 (vermelho) e cy5 (verde) dyes (Dye swap). Utilizou-se o RNA amplificado da célula HB4A como referência para as hibridizações de todas as amostras.

Partindo-se da amostra de RNA amplificado, foi sintetizada a sonda de cDNA marcada com dUTP conjugada a fluorocromo através de uma reação de transcrição-reversa. Oito µg de RNA foram precipitados com 10% de acetato de sódio 3M e 3 volumes de etanol a - 70°C por, no mínimo, 16 horas. Em seguida, o RNA foi centrifugado e lavado com etanol 70%. O RNA foi dissolvido em 4 µL de água tratada com DEPC e aquecido a 70°C por 10 minutos na presença de 2,5 µg de oligo dT (Oligo dT₁₂₋₁₈, Gibco BRL) para abertura de possíveis estruturas secundárias sendo, em seguida, resfriado em gelo por 2 minutos. Os mRNAs foram transcritos reversamente à primeira fita de cDNA na

presença de 400U da enzima transcriptase-reversa (SuperScript II, Gibco BRL), 500 μ M de cada desoxinucleotídeo dATP, dGTP e dCTP e 100 μ M de dTTP, 1mM DTT, 1X de tampão de transcrição reversa (Gibco), 40U de inibidor de Rnase (Rnasin, Promega) e 3 mM de Cy-3 dUTP/Cy-5 dUTP em uma reação com volume final de 50 μ L. A reação de síntese de cDNA foi então incubada a 42°C por 2 horas sendo a hidrólise do RNA feita pela adição de 1,5 μ L de EDTA 0,5M e 1,5 μ L de NaOH 0,1M, seguida de incubação a 70°C durante 20 minutos, esta reação foi neutralizada pela adição de 1,5 μ L de HCl 1M.

Os nucleotídeos não incorporados foram removidos através de uma etapa de purificação em microcoluna Autoseq G50 (Amersham Pharmacia, cat # 27-5340-01). A sonda de cDNA foi então dissolvida em 47,5 μ L de tampão de hibridização (10X SSC, 0,2%SDS) e 23,75 μ L de formamida deionizada (Sigma). Quantidades iguais das sondas de cDNA marcadas com fluorocromo e correspondentes a cada uma das amostras a serem comparadas foram misturadas e aquecidas a 95°C por 5 minutos. Para a hibridização, adicionou-se todo o volume das sondas sobre a lâmina de cDNA microarray a ser hibridizada. A hibridização foi feita em estação de hibridização GeneTac 2000 (Genomic Solutions, Reino Unido) a 42°C durante 24 horas.

Em seguida à reação de hibridização, foram feitas lavagens sucessivas da lâmina em solução de SSC 2X sob 5 minutos de agitação, solução de SSC 0,1% e SDS 0,1% sob agitação por 15 minutos. Por último, a lâmina foi lavada com solução de SSC 0,1%, sob 5 minutos de agitação e posteriormente centrifugada por 5 minutos a 1000 rpm, para posterior leitura e análise dos resultados.

3.10 Leitura e Normalização dos dados

Os sinais gerados pela hibridização dos cDNAs das amostras (marcadas com Cy3 e Cy5) às sequências fixadas nas lâminas de vidro foram capturadas utilizando-se um scanner a laser confocal com canal duplo, o ScanArray Express (Perkin Elmer Life Sciences, Inc., Boston, MA, EUA). Este scanner localiza os pontos de hibridização e adquire os dados correspondentes aos sinais de fluorescência emitidos pelo material presente nas lâminas de hibridização, quando os fluorocromos Cy3 e Cy5 são excitados pelo laser emitido pelo sistema. O sistema permite a quantificação do sinal desde que a luz emitida pelos fluorocromos excitados é convertida em energia elétrica, produzindo um sinal mensurável, que é proporcional ao número de fótons detectados. Este sistema a laser produz dados com menos variância, pois a leitura é sensível, com resolução de 5 μm , e o sistema de filtros permite aumento da intensidade do sinal alvo enquanto um aparato, que bloqueia a passagem de luz refletida, proporciona a eliminação do ruído com maior eficiência.

Os dados foram adquiridos usando-se idênticas voltagens de fotomultiplicador (PMT 50/50) para todas as amostras e quantificados através do programa de análises ScanArray Express (Perkin Elmer Life Sciences, Inc., Boston, MA, EUA). Este programa permite a localização automática dos pontos de cDNA hibridizados na lâmina basendo-se em marcadores de posição, e o refinamento desta localização foi realizado de forma manual. O programa realiza o cálculo do volume de cada ponto de hibridização para cada uma das amostras (célula em questão ou célula referência), o qual corresponde

à intensidade média e desvio padrão da fluorescência de cada sinal individual (pixel) gerado por fluorocromo verde ou vermelho, multiplicada pela área de hibridização. As imagens decompostas (fluorocromo verde ou vermelho) separadamente ou compostas (ambos os fluorocromos conjuntamente) foram gravadas como imagens 16-bit TIFF.

A próxima etapa do processo foi a subtração do ruído (background), que corresponde à marcação inespecífica, isto é, pontos de hibridização de baixa intensidade de sinal de fluorescência, incluídos no percentil 95% de distribuição de intensidades dos pontos que são controles negativos da hibridização. Foram também eliminados os sinais onde ocorreu a saturação de hibridização (intensidade de sinal > 63.000). Neste último caso, o excesso de material hibridizado gera um sinal muito intenso, que supera a capacidade do detector de medir a intensidade de fluorescência, e invalida a quantificação e comparações, devendo portanto, ser eliminado de futuras análises.

A réplica técnica ou inversão de corantes para marcação da mesma amostra, foi utilizada para identificar variações que possam ocorrer durante a marcação da amostra com fluorocromo, isto é, caso determinado cDNA apresente marcação preferencial com o fluorocromo verde ou vermelho. Como estamos fazendo comparações entre amostras idênticas, espera-se que obtenhamos medidas consistentes, isto é, sem variações. Portanto, sinais de hibridização correspondendo à expressão de um mesmo gene, mas cuja energia foi diferente entre a mesma amostra marcada com os diferentes fluorocromos, foram eliminados de futuras análises.

3.11 Análise matemática dos dados

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

Para identificar os genes diferencialmente expressos calculou-se o logaritmo da razão da expressão de cada gene da célula analisada em relação a células de referência ($\log_2$ razão), assumiu-se que estes valores têm distribuição normal. Após a transformação logarítmica, os dados foram normalizados por Lowess (local weight regression).

Para o cálculo da média da expressão gênica, foram considerados os valores obtidos nas duas hibridizações de cada amostra, usando-se a inversão dos corantes Cy3 e Cy5 (Dye swap). Foi aplicado o teste t de student permutado para o cálculo do nível de significância, e como teste para correção de múltiplas análises, utilizou-se o FDR, “False Discovery Ratio”. Foram considerados diferencialmente expressos aqueles genes cujos pFDRs foram $< 0,01$ e onde a variação de expressão foi maior que duas vezes entre os grupos analisados.

Para as comparações de microarrays, que determinaram os genes diferencialmente expressos em células epiteliais e fibroblastos mantidos isoladamente em cultura ou após terem sido co-cultivados, foram analisados os seguintes grupos:

G6: Fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos isoladamente

G4: Fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos isoladamente

G5: Fibroblastos de linfonodos não comprometidos cocultivados com MCF10A

G10: Fibroblastos de linfonodos não comprometidos cocultivados com MDA-MB-231

G3: Fibroblastos de linfonodos comprometidos cocultivados com MCF10A

G9: Fibroblastos de linfonodos comprometidos cocultivados com MDA-MB-231

Os fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos ou não comprometidos mantidos isoladamente em cultura foram os mesmos utilizados nas suas respectivas co-culturas com células epiteliais MCF10A ou MDA –MB231.

Para as hibridizações das lâminas de cDNA microarrays, que formam cada um destes grupos, 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. Também foram usadas três amostras de fibroblastos de linfonodos de pacientes diferentes naqueles grupos que descrevem os diferentes tipos de co-cultura.

Foram realizadas as seguintes comparações entre os grupos citados para as análises de expressão gênica diferencial por microarrays:

G4 X G6 (Fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos isoladamente comparados com Fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos isoladamente)

G5 X G6 (Influência da MCF10A em Fibroblastos de linfonodos não comprometidos)

G3 X G4 (Influência da MCF10A em Fibroblastos de linfonodos comprometidos)

G10 X G6 (Influência da MDA-MB-231 em Fibroblastos de linfonodos não comprometidos)

G9 X G4 (Influência da MDA-MB-231 em Fibroblastos de linfonodos comprometidos)

3.12 Análises de expressão gênica

Os genes diferencialmente expressos foram analisados usando o programa FatiGO que classifica os genes segundo a sua anotação ontológica dentro de processos biológicos. Os genes também foram classificados de acordo com a sua categoria dentro de processos biológicos usando o método “Onto-Express” que considera a análise ontológica em um modelo numérico estatístico e cuja idéia fundamental é atribuir um nível de significância às várias categorias funcionais e levando em consideração o genes que foram imobilizados na lâmina de cDNA microarray que pertencem a determinadas categorias funcionais (Khatri & Drăghici, 2005) Esta análise foi realizada através do site <http://vortex.cs.wayne.wayne.edu> .

3.13 RT-PCR EM TEMPO REAL

A validação dos resultados obtidos em cDNA microarrays, na comparação da expressão gênica de fibroblastos de linfonodos comprometidos e não comprometido, foi realizada através da PCR em tempo real. Esta PCR

avalia o acúmulo do produto na fase logarítmica da reação de amplificação, o qual está diretamente relacionado à quantidade de molde existente no início da reação, sendo atualmente considerado um método bastante preciso e reprodutível para a quantificação da expressão gênica.

Utilizamos o sistema de detecção por SYBR Green, que se baseia no uso de uma molécula fluorescente, denominada SYBR Green I, que quando intercalada à dupla fita da DNA, passa a ser detectável. Durante os ciclos iniciais da reação de PCR, o sinal de fluorescência emitido pelo SYBR Green I é fraco para ser detectado, isto é, não ultrapassa o sinal de fluorescência de fundo. Entretanto, no decorrer dos ciclos da reação de PCR, há o aumento do produto amplificado e conseqüentemente o aumento do sinal de emissão de fluorescência, passando a ser detectável, sendo assim os valores são quantificados depois de um número fixo de ciclos, o que representa a quantidade final de cada produto acumulado, diferente da reação de PCR convencional. 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. 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 de amplificação inespecíficos. 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.

Neste método de detecção, a confirmação de especificidade da amplificação é realizada por meio da 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 *Tm* 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 faixa em que a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras torna-se significativamente maior que a fluorescência da base (background). O limiar é definido na fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formada traduz de forma satisfatória a concentração inicial de fitas molde (cDNA) amplificadas pela reação. 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 mostram valores de Ct mais baixos. Quando a eficiência da reação de 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 da PCR, onde **N_f** é o número de fita-molde em um determinado ciclo da reação, **N_o** é o número de fita molde inicial, **E** é a eficiência de amplificação da reação e **n** é o número de ciclos.

Considerando que a eficiência da reação seja de 100% (log E=1) e que n seja um ponto escolhido da amplificação idêntico, a todas amostras, poderemos obter o número de fitas-molde presentes no início da reação, com a equação:

$$N_o = N_f \times 2^{-Ct}.$$

A análise da expressão gênica por meio de PCR em tempo real 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.

A quantificação relativa por PCR em tempo real para uma determinada amostra é dada pela relação do Ct do gene de interesse (i) e o Ct do controle endógeno (e). Assim temos:

$$\underline{Nfi = Noi \times 2^{-Cti}} \text{ (gene de interesse)}$$

$$Nfe = Noe \times 2^{-Cte} \text{ (gene endógeno)}$$

Sendo que Nfi/Nfe é a quantidade normalizada de moléculas do gene de interesse em relação ao número de moléculas do controle endógeno que iremos chamar de X, e Nfe e Nfi uma constante que nomeamos por K, a equação fica:

$$X = K \cdot 2^{-\Delta Ct}$$

A quantificação relativa da expressão gênica é usada para descrever mudanças na expressão de um gene de interesse em um grupo de amostras em relação a um grupo de referência. Neste trabalho utilizamos uma amostra de células HB4a. Assim o valor de X é medido em duas diferentes condições, logo dividimos a condição A pela condição B e obtemos $2^{-\Delta\Delta Ct}$, como mostra equação a seguir:

$$\frac{Xa}{Xb} = \frac{K \times 2^{-\Delta Ct_a}}{K \times 2^{-\Delta Ct_b}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Este método foi utilizado em nosso estudo para determinar os níveis de expressão relativa dos genes de interesse.

Os “primers” usados nos ensaios de RT-PCR semiquantitativo foram desenhados utilizando-se o programa “Primer3 Output” (Rozen & Skaletsky, 2000) que se encontra disponível no endereço:

<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>.

4. Resultados

4.1 Cultura primária de fibroblastos obtidos de linfonodo axilar humano

Foram estabelecidas as culturas primárias de fibroblastos provenientes de linfonodos axilares não comprometidos de 6 pacientes com câncer de mama e de fibroblastos derivados de linfonodos axilares comprometidos por células cancerosas obtidos de 7 pacientes com câncer de mama.

Observou-se o surgimento dos primeiros fibroblastos saindo dos explantes de tecido linfonodal axilar humano (Figura 4A), em média, no sétimo dia após terem sido colocados em cultura, período no qual também verificou-se grande quantidade de linfócitos ao redor de cada explante, como podemos observar na Figura 4B. A partir da segunda semana de cultivo, os fibroblastos continuaram em intensa proliferação, enquanto que o número de linfócitos foi desaparecendo gradativamente, a cada nova troca de meio das garrafas (Figura 5A). Ao se completar 4 semanas de cultura, os fibroblastos atingiram confluência em torno dos explantes, assim como em praticamente toda a superfície da garrafa, quando, então, os explantes foram retirados da mesma. Os fibroblastos demoraram em torno de mais uma semana até cobrirem a área onde antes haviam explantes, período no qual quase já não se viam linfócitos, e, finalmente, realizou-se nesta fase a primeira tripsinização, iniciando-se a contagem das passagens em cultura destes fibroblastos. Consideramos a obtenção de uma população pura de fibroblastos a partir da terceira passagem (Figura 5B), o que nos foi confirmado realizando-se os ensaios de caracterização imunocitoquímica destas células, como veremos adiante.

Figura 4A

Figura 4B

Figuras 4A e 4B - Na Figura 4A observa-se fibroblasto saindo do explante de tecido linfonodal axilar de paciente com câncer de mama no sétimo dia de cultivo. Nesta fase também verificamos a proliferação de linfócitos contaminantes, como podemos ver na Figura 4B. As culturas primárias foram mantidas em estufas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ (Aumento original x100).

Figura 5A

Figura 5B

Figuras 5A e 5B – Cultura primária de fibroblastos obtidos de tecido linfonodal axilar de paciente com câncer de mama. A Figura 5A mostra fibroblastos durante a terceira semana de cultivo, quando ainda encontramos alguns linfócitos. Na Figura 5B podemos observar uma população homogênea de fibroblastos em uma cultura estabelecida na terceira passagem. As culturas primárias foram mantidas em estufas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ (Aumento original x100).

4.2 Caracterização Imunocitoquímica dos fibroblastos obtidos de linfonodo axilar humano

Os fibroblastos obtidos de linfonodo axilar humano foram caracterizados por ensaio de imunocitoquímica, apresentando os mesmos positividade de expressão nas reações com os anticorpos contra os filamentos intermediários de vimentina e também com anticorpos contra actina de músculo liso. Não houve expressão de citoqueratina, independente destas células serem derivados de linfonodos comprometidos ou não pelo câncer. Os resultados das reações de imunocitoquímica nos confirmaram a homogeneidade destas populações de fibroblastos a partir da terceira passagem, como podemos observar nas figuras 6A e 6B de imunofluorescência.

Figura 6A

Figura 6B

Figuras 6A e 6B - Expressão de filamentos citoplasmáticos de vimentina (6A) e actina de músculo liso (6B) em fibroblastos obtidos de linfonodo axilar de paciente com câncer de mama. Fibroblastos foram obtidos de cultura primária de tecido linfonodal e cultivados sobre lamínulas de vidro que foram mantidas em estufas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas. As células foram fixadas e permeabilizadas com acetona 70% e a seguir coradas com anticorpo contra vimentina e actina de músculo liso. A técnica de imunocitoquímica foi realizada como descrito em material e métodos (x200).

Figura 6D - Ausência de expressão de citoqueratina em fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos de paciente com câncer de mama. Fibroblastos foram obtidos de cultura primária de tecido linfonodal e cultivados sobre lamínulas de vidro que foram mantidas em estufas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas. As células foram fixadas e permeabilizadas com acetona 70% e a seguir coradas com anticorpo contra citoqueratina. A técnica de imunocitoquímica foi realizada como descrito em material e métodos (x200).

4.3 Proliferação dos Fibroblastos provenientes de linfonodo axilar humano

Para a determinação da proliferação celular, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com solução de tetrazólio de sódio, como descrito anteriormente. Foi realizado um intervalo de 0 a 120 horas, sendo que o tempo 0h serviu como parâmetro para as quantificações posteriores. Como podemos visualizar no Gráfico 1, os fibroblastos derivados de linfonodo axilar não acometido e os fibroblastos derivados de linfonodo acometido apresentaram proliferação semelhante (Teste de Mann Whitney; $p=0,5204$).

Gráfico 1: Curva de proliferação de fibroblastos derivados de linfonodos de pacientes com câncer de mama (3 linfonodos comprometidos por células cancerosas e 3 linfonodos não comprometidos, de 6 diferentes pacientes). Cada ponto do gráfico representa ensaios em triplicata de cada amostra. n-iLNFB: fibroblastos de linfonodos não comprometidos; iLNFB: fibroblastos de linfonodos comprometidos.

4.4 Co-culturas de fibroblastos de linfonodo e células epiteliais

As co-culturas foram realizadas como descrito anteriormente em métodos. Nas figuras abaixo podemos observar a morfologia das células mantidas em co-cultura após 24, 48 e 72 horas. Como podemos observar nas figuras de co-culturas de fibroblastos de linfonodo comprometido com células epiteliais mamárias MCF10A (Figura 7) e das co-culturas de fibroblastos de linfonodo comprometido com células epiteliais mamárias MDA MB 231 (Figura 8), as características morfológicas dos fibroblastos assim como as das células epiteliais foram preservadas durante o período em que permaneceram em co-cultura.

Figura 7 : Co-culturas de fibroblastos de linfonodos comprometidos com células epiteliais mamárias MCF10A.

Fibroblastos

Células Epiteliais MDA MB 231

Figura 8: Co-culturas de fibroblastos de linfonodos comprometidos com células epiteliais mamárias MDA MB 231

4.5 Amostras de RNAs obtidos de Fibroblastos de linfonodos

Na figura 9 podemos visualizar amostras de RNAs totais obtidos de fibroblastos derivados de linfonodo comprometido pelo câncer e de linfonodo não comprometido, onde observamos as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S. Nestes casos, a relação entre as bandas 28S/18S aproximou-se de 2. As amostras consideradas de boa qualidade tiveram os seus mRNAs amplificados e foram, posteriormente, utilizadas nos ensaios de hibridização de cDNA microarrays.

Figura 9 – Amostras de RNAs totais obtidos de fibroblastos derivados de linfonodos não comprometidos (A, B e C) e de linfonodos comprometidos (D e E).

4.6 Amplificação e Hibridização de RNAm das Células Epiteliais Mamárias e de Fibroblastos de Linfonodos

As células epiteliais mamárias HB4A foram utilizadas como referência em todas as hibridizações de microarray, ou seja, foram um fator denominador comum entre todas as outras amostras. Para tanto, amplificamos o RNA extraído desta linhagem celular diversas vezes para obter uma massa crítica suficiente para utilização em todas as hibridizações posteriores. Dessa forma, garantimos que todas as hibridizações tivessem

como referência uma única amostra de RNA original. Na figura 10 podemos visualizar amostras amplificadas do mRNA de células epiteliais HB4A, MCF10A e MDA-MB-231 e dos mRNAs de fibroblastos de linfonodo comprometido e não comprometido.

Em todas as amplificações os transcritos situam-se entre 400 e 700 bp, caracterizando uma amplificação de boa qualidade.

Figura 10: Em A observa-se o Padrão de peso molecular (100 bp); em B, C, D, E e F o RNAm amplificado das amostras de células HB4A, MCF10A, MDA-MB-231, fibroblastos de linfonodo não comprometido e fibroblastos de linfonodo comprometido

Na figura 11 podemos observar a Imagem da hibridização de uma amostra de células epiteliais MDA-MB-231 cocultivadas com fibroblastos de linfonodos não comprometidos em lâmina de cDNA microarray.

Figura 11: Imagem da hibridização de uma amostra de fibroblastos de linfonodos não comprometidos cocultivados com células epiteliais MDA-MB-231 em lâmina de cDNA microarray. À esquerda temos a imagem que representa a amostra de cocultura marcada com Cy3 dUTP (verde) e no centro a imagem da amostra da célula referência (HB4A) marcada com Cy5 dUTP (vermelho). A imagem da direita mostra a composição da hibridização dos dois tipos celulares. Foram realizados dois ensaios, ambos com inversão de corantes entre as amostras, com resultados similares. Os sinais gerados pela hibridização competitiva das duas amostras foram capturadas e quantificadas utilizando-se um scanner a laser confocal com canal duplo (ScanArray Express).

4.7 Perfil da expressão gênica diferencial de fibroblastos originários de linfonodos comprometidos por metástase de câncer de mama.

Treze genes foram diferencialmente expressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos (iLNFb) em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos (n-iLNFb) obtidos de pacientes com câncer de mama, mantidos isoladamente em cultura. Quatro e nove genes foram, respectivamente, hiperexpressos e hipoexpressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos (Diagrama de Venn A), e a relação da expressão variou de 2,01 a 2,85 vezes. Grande parte destes genes (cinco genes) estão relacionados a processos metabólicos e alguns ainda não possuem anotação, segundo sua classificação ontológica (GO) (Tabela 3).

A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado, utilizando a expressão diferencial destes genes, foi capaz de classificar corretamente os fibroblastos provenientes de linfonodos comprometidos em relação aos fibroblastos de linfonodos não comprometidos obtidos de pacientes com câncer de mama (Figura 12).

Para confirmação destas expressões gênicas diferenciais, realizamos experimentos adicionais usando amostras de fibroblastos de linfonodos obtidas das 6 pacientes inicialmente analisadas em ensaios de cDNA microarrays, e de outras 4 pacientes (10 diferentes pacientes com câncer de mama, sendo 5 delas com comprometimento linfonodal e as outras 5 sem comprometimento linfonodal), amostras estas obtidas em três passagens celulares consecutivas. A expressão gênica nestes fibroblastos foi, então, avaliada com o uso da tecnologia do RT-PCR quantitativo, e os resultados obtidos estão descritos nas páginas 92 a 97.

Diagrama de Venn A: Número de genes diferencialmente expressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos. Em azul, representação do número de genes com expressão similar em ambos os tipos de fibroblastos e, em vermelho, número de genes diferencialmente expressos.

Figura 12: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos e de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos não comprometidos de pacientes com câncer de mama. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada das amostras de fibroblastos de linfonodos mantidos isolados em cultura. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

Tabela 3: Genes diferencialmente expressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos em relação a fibroblastos derivados de linfonodos não comprometidos. Distribuição quanto à ontologia gênica (Processo biológico, função molecular ou componente celular). iLNFb: fibroblastos de linfonodos comprometidos; n-iLNFb: fibroblastos de linfonodos não comprometidos

Classificação Ontológica	Genes Hiperexpressos em iLNFb / n-iLNFb	Genes Hipoexpressos em iLNFb / n-iLNFb
Metabolismo		COPS5 PSMA5 MRPL22 BCS1L
Metabolismo de RNA	PTBP2	
Transporte		TRAPPC1
Desenvolvimento	HEG	
Atividade Catalítica Transcrição	PGBD3	AKAP8L
GO desconhecido	ARRDC3	C14orf109 C14orf123 LOC51035

4.8 Perfil gênico de fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos ou não comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A) ou malignas (MDA-MB-231).

Fibroblastos de linfonodos, comprometidos ou não, foram mantidos em co-cultura com células epiteliais mamárias normais ou malignas, separados por membrana porosa, sob a ação de fatores solúveis. Determinamos, então, em fibroblastos de linfonodos, os genes regulados nas condições de co-cultura, em relação a fibroblastos de linfonodos cultivados isoladamente. Todas as condições de cocultura mostraram um grande número de genes diferencialmente expressos.

Duzentos e vinte e um genes foram modulados em fibroblastos de linfonodos não comprometidos quando co-cultivados com células MCF10A e 151 genes quando em co-cultura com células MDA-MB-231. Um maior número de genes, 362, foi regulado em fibroblastos de linfonodos comprometidos quando co-cultivados com células MCF10A, e, nestes mesmos fibroblastos, fatores solúveis liberados por células MDA-MB-231 foram capazes de modular a expressão de 249 genes.

Dentre os genes diferencialmente expressos, alguns foram modulados em mais de uma condição de co-cultura, como pode ser visto nos diagramas de Venn B e C, que representam, respectivamente, o número de genes hiperexpressos e hipoexpressos em todas as quatro condições de co-cultura realizadas. As áreas de intersecções em cada diagrama representam o número de genes comumente modulados em duas, três ou quatro condições de co-cultura de fibroblastos de linfonodos com células epiteliais mamárias.

Diagrama de Venn B: Número de genes hiperexpressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos (iLNFB) ou não comprometidos (n-iLNFB) por células cancerosas de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A) ou malignas (MDA-MB-231). O número total de genes hiperexpressos em cada uma das quatro condições de co-cultura aparece entre parênteses. Fora do diagrama estão o número de genes comumente hiperexpressos nas co-culturas (iLNFB + MCF10A) e (n-iLNFB + MDA-MB-231), 5 genes, e de genes comumente modulados nas co-culturas (n-iLNFB + MCF10A) e (iLNFB + MDA-MB-231), 2 genes.

Diagrama de Venn C: Número de genes hipoexpressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos (iLNFB) ou não comprometidos (n-iLNFB) por células cancerosas de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A) ou malignas (MDA-MB-231). O número total de genes hipoexpressos em cada uma das quatro condições de co-cultura aparece entre parênteses. Fora do diagrama estão o número de genes comumente hipoexpressos nas co-culturas (iLNFB + MCF10A) e (n-iLNFB + MDA-MB-231), 4 genes, e de genes comumente modulados nas co-culturas (n-iLNFB + MCF10A) e (iLNFB + MDA-MB-231), 2 genes.

4.9 Perfil da expressão gênica de fibroblastos obtidos de linfonodos não comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A).

Duzentos e vinte e um genes foram diferencialmente expressos em fibroblastos obtidos de linfonodos não comprometidos quando mantidos em co-cultura com células mamárias normais MCF10A, em relação aos mesmos fibroblastos mantidos isoladamente em cultura, sendo que 70 genes foram encontrados hiperexpressos e 151 hipoexpressos, nas condições de co-cultura. A variação da expressão gênica foi de 2 a 18,29 vezes.

A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado, utilizando a expressão diferencial destes genes, foi capaz de classificar corretamente os fibroblastos provenientes de linfonodos não comprometidos co-cultivados com células epiteliais mamárias normais MCF10A, em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos isolados em cultura (Figuras 13A, 13B e 13C).

Considerando-se os genes diferencialmente expressos em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivados com células MCF10A, algumas das categorias funcionais significativamente moduladas, de acordo com a sua representação na plataforma de cDNA microarray utilizada neste trabalho, foram: metabolismo de lipídios, transcrição, regulação da transcrição dependente de DNA, regulação da transcrição, regulação do início da tradução, modificação de proteínas e citocinese. As demais categorias funcionais significativamente moduladas nesta condição de co-cultura podem ser observadas na Tabela 4 em anexos

(<http://vortex.cs.wayne.edu>). Nesta condição de co-cultura, também encontramos significativamente modulada a via de regulação do citoesqueleto de actina. Uma representação desta via de sinalização, gerada pelo programa KEGG PATHWAY Database, pode ser observada em anexos (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) (Figura 14).

A maioria destes genes diferencialmente expressos estão envolvidos, segundo a sua classificação ontológica, em: processos fisiológicos celulares (82,91%), metabolismo (65,81%), regulação de processos fisiológicos (26,5%), localização (26,5%), comunicação celular (24,79%), entre outros. Alguns genes ainda não possuem anotação ontológica em processos biológicos (Tabela 5A).

Dentre os 70 genes hiperexpressos em fibroblastos originários de linfonodos não comprometidos quando co-cultivados com células epiteliais MCF10A, em relação aos mesmos fibroblastos mantidos isoladamente em cultura, observamos que 25 genes foram regulados apenas pela presença da MCF10A, isto é, somente nestas condições de co-cultura, sendo que quatro destes genes apresentaram variação de expressão superior a três vezes: CNAP1, KIAA1529, MYH9 e NUP133. Estes genes foram classificados de acordo com a sua anotação ontológica em processos biológicos e tiveram a seguinte distribuição: metabolismo (58,33%); processos fisiológicos celulares (50%); comunicação celular (33,33%); morfogênese (16,67%), etc (Tabela 5B).

Dentre os 151 genes hipoexpressos, 55 genes foram modulados exclusivamente em fibroblastos obtidos de linfonodos não comprometidos mantidos na presença de células MCF10A, em relação a fibroblastos de

linfonodos não comprometidos mantidos isoladamente. Estes genes foram classificados de acordo com a sua anotação ontológica e tiveram a seguinte distribuição: metabolismo (80%), processos fisiológicos celulares (28%), comunicação celular (20%), processos fisiológicos de regulação (12%), resposta a estímulo (12%). Dez destes genes tiveram variação de expressão superior a três vezes (ANGPTL2, COPS5, HRAS, KIAA0218, NIFIE14, PEG10, SFRP1, TM4SF3, TRAPPC1 e UXT), sendo que três deles, com variação maior que cinco vezes: ANGPTL2, HRAS e UXT (Tabela 5B).

Figura 13A: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos derivados de linfonodos não comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A), e de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos em cultura isoladamente. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada dos fibroblastos de co-cultura daqueles fibroblastos mantidos isolados. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

Figura 13B: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos derivados de linfonodos não comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A), e de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos em cultura isoladamente. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada dos fibroblastos de co-cultura daqueles fibroblastos mantidos isolados. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

Figura 13C: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos derivados de linfonodos não comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A), e de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos em cultura isoladamente. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada dos fibroblastos de co-cultura daqueles fibroblastos mantidos isolados. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

4.10 Perfil da expressão gênica de fibroblastos obtidos de linfonodos não comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB-231).

Cento e cinquenta e um genes foram modulados em fibroblastos originários de linfonodos não comprometidos mantidos em co-cultura com células MDA-MB-231, em relação aos mesmos fibroblastos cultivados na ausência de células epiteliais, sendo que 53 genes foram encontrados hiperexpressos e 98 genes hipoexpressos nas condições de co-cultura. A variação da expressão gênica foi de 2 a 9 vezes.

A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado, utilizando a expressão diferencial destes genes, foi capaz de classificar corretamente os fibroblastos provenientes de linfonodos não comprometidos co-cultivados com células epiteliais mamárias malignas MDA-MB-231, em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos isolados em cultura (Figuras 15A, 15B e 15C).

Considerando-se os genes diferencialmente expressos em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivados com células MDA-MB-231, algumas das categorias funcionais significativamente moduladas, de acordo com a sua representação na plataforma de cDNA microarray utilizada neste trabalho, foram: biossíntese de proteínas, regulação do início da tradução, indução de apoptose por sinalização extracelular, processamento de rRNA, transporte do ER para o Golgi, citocinese e resposta de defesa celular. As demais categorias funcionais significativamente moduladas nesta condição de co-cultura podem ser observadas na Tabela 6 em anexos

(<http://vortex.cs.wayne.edu>). Nesta condição de co-cultura encontramos também significativamente moduladas as vias de sinalização do cálcio, da insulina, do hormônio liberador de gonadotrofina, da regulação do citoesqueleto de actina. As representações destas vias de sinalização, geradas pelo programa KEGG PATHWAY Database, podem ser observadas em anexos (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>. (Figura 16, 17, 18,19).

Dentre todas as categorias funcionais significativamente moduladas, encontram-se funções que foram reguladas exclusivamente nestes fibroblastos de linfonodos não comprometidos por influência de fatores solúveis derivados da célula MDA-MB-231: ativação do fator de transcrição NF-kappaB, morte celular, resposta de defesa celular, metabolismo de ceramidas, transporte de ácidos dicarboxílicos, reparo de quebra de dupla fita, transporte do Golgi para ER, desenvolvimento cardíaco, biossíntese de heme, indução de apoptose por sinalização extracelular, biossíntese de leucotrienos, transporte de L-glutamato, metabolismo de compostos nitrogenados, sinalização mediada por fosfoinositídeo, regulação positiva da transcrição, biossíntese de proteínas, “targeting” de proteína mitocondrial, importação de proteínas do núcleo, resposta a estímulos de quebra do DNA, resposta à peste, patógeno ou parasita, processamento de rRNA e metabolismo de superóxidos (<http://vortex.cs.wayne.edu>).

Estes genes estão envolvidos, segundo a sua anotação ontológica em processos biológicos, em: processos fisiológicos (86,52%), metabolismo (73,03%), regulação de processos celulares (28,09%), regulação de processos fisiológicos celulares (26,97%), comunicação celular, entre outros (Tabela 7A).

Dentre os 53 genes hiperexpressos em fibroblastos originários de linfonodos não comprometidos quando cocultivados com células epiteliais mamárias MDA-MB-231, em relação aos mesmos fibroblastos mantidos isoladamente em cultura, observamos que 23 genes foram regulados apenas pela presença da MDA-MB-231, isto é, somente nesta condição de co-cultura, cinco dos quais, com variação superior a três vezes (BET1, ENTPD1 e USP7). Inclusive, BET1 apresentou variação de expressão superior a cinco vezes. Estes genes foram classificados de acordo com a sua anotação ontológica e tiveram a seguinte distribuição: metabolismo (60%), comunicação celular (46,67%), processos fisiológicos celulares (46,67%), resposta a estímulo (33,33%),etc (Tabela 7B).

Dentre os 98 genes hipoexpressos em fibroblastos obtidos de linfonodos não comprometidos mantidos na presença de células MDA-MB-231, encontram-se 18 genes exclusivamente hipoexpressos por ação de fatores solúveis liberados de células MDA-MB-231, sendo que três deles sofreram variação maior que três vezes: DAPK1, ERBB2 e NCF2. Estes genes foram classificados de acordo com a sua anotação ontológica e tiveram a seguinte distribuição: metabolismo (85%), processos fisiológicos celulares (50%), processos fisiológicos organismal (21,43%), resposta a estímulo (21,43%), etc (Tabela 7B).

Figura 15A: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) 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 (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos em cultura isoladamente. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada dos fibroblastos de co-cultura daqueles fibroblastos mantidos isolados. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

Figura 15B: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) 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 (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos em cultura isoladamente. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada dos fibroblastos de co-cultura daqueles fibroblastos mantidos isolados. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

Figura 15C: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) 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 (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos em cultura isoladamente. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada dos fibroblastos de co-cultura daqueles fibroblastos mantidos isolados. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

4.11 Perfil da expressão gênica de fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A)

Trezentos e sessenta e dois genes foram diferencialmente expressos por fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos quando mantidos em co-cultura com células mamárias normais MCF10A, em relação aos mesmos fibroblastos mantidos isoladamente em cultura, sendo que 170 genes foram hiperexpressos e 191 hipoexpressos, nas condições de co-cultura. A variação da expressão gênica foi de 2 a 14,57 vezes.

A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado, utilizando a expressão diferencial destes genes, foi capaz de classificar corretamente os fibroblastos provenientes de linfonodos comprometidos co-cultivados com células epiteliais mamárias normais MCF10A, em relação a fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos isolados em cultura (Figuras 20A, 20B, 20C, 20D e 20E).

Dentre os genes diferencialmente expressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos co-cultivados com células MCF10A, algumas das categorias funcionais significativamente moduladas, de acordo com a sua representação na plataforma de cDNA microarray utilizada neste trabalho, foram: metabolismo de lipídios, biossíntese de ácidos graxos, metabolismo de ácidos graxos, resposta humoral antimicrobial, transporte de prótons, transporte retrógrado do Golgi para ER, transporte de íon metal, ativação de MAPK e contração de músculo liso. As demais categorias funcionais

significativamente moduladas nesta condição de co-cultura podem ser observadas na Tabela 8 em anexos (<http://vortex.cs.wayne.edu>).

Estes genes diferencialmente expressos estão envolvidos, segundo a sua classificação ontológica, em: processos fisiológicos celulares (85,85%), metabolismo (66,04%), regulação de processos celulares (25,94%), regulação de processos fisiológicos (25,47%), localização (23,11%), entre outras classificações. Alguns genes ainda não possuem anotação ontológica descrita em processos biológicos (Tabela 9).

Dentre os 170 genes hipexpressos em fibroblastos originários de linfonodos comprometidos quando cocultivados com células epiteliais MCF10A, em relação aos mesmos fibroblastos mantidos isoladamente em cultura, observamos que 70 genes foram regulados apenas pela presença da MCF10A, isto é, somente nestas condições de co-cultura, sendo que 11 deles apresentaram variação de expressão superior a três vezes (COL16A1, GMPPA, LRP4, MACF1, MGC3047, MLZE, MR3-GN0186-009-H05, MRPL2, PFKFB4, RAI e TDE2L). Estes genes foram classificados de acordo com a sua anotação ontológica e tiveram a seguinte distribuição: metabolismo (54,35%), processos fisiológicos celulares (43,48%), comunicação celular (28,26%), resposta a estímulo (19,57%),etc (Tabela 5B).

Dentre o total de 192 genes hipoexpressos, 68 genes foram modulados negativamente exclusivamente em fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos quando mantidos na presença de células MCF10A, em relação a fibroblastos de linfonodos comprometidos isolados. Quinze genes tiveram variação de expressão superior a três vezes: C1orf24, CLCA4, EDNRB, HADHSC, KIAA1102, Lrp2bp, MIR, MOXD1, RC3-CI0043-024-D07, SEMA4A,

VDRIP e ZNF364, incluindo três com variação maior que 5 vezes, FGL2, LR8 e NOX4. Estes genes foram classificados de acordo com a sua anotação ontológica e tiveram a seguinte distribuição: metabolismo (85%), processos fisiológicos celulares (27,78%), morfogênese (16,67%), comunicação celular (16,67%),etc (Tabela 5B).

Figura 20A: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A), e de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos em cultura isoladamente. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada dos fibroblastos de co-cultura daqueles fibroblastos mantidos isolados. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

Figura 20B: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A), e de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos em cultura isoladamente. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada dos fibroblastos de co-cultura daqueles fibroblastos mantidos isolados. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

Figura 20C: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A), e de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos em cultura isoladamente. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada dos fibroblastos de co-cultura daqueles fibroblastos mantidos isolados. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

Figura 20D: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A), e de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos em cultura isoladamente. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada dos fibroblastos de co-cultura daqueles fibroblastos mantidos isolados. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

Figura 20E: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias normais (MCF10A), e de 3 amostras (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos em cultura isoladamente. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada dos fibroblastos de co-cultura daqueles fibroblastos mantidos isolados. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

4.12 Perfil da expressão gênica de fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos de pacientes com câncer de mama, após co-cultura com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB-231)

Duzentos e quarenta e nove genes foram diferencialmente expressos em fibroblastos originários de linfonodos comprometidos mantidos em co-cultura com células MDA-MB-231 em relação aos mesmos fibroblastos cultivados na ausência de células epiteliais, sendo que 123 genes foram encontrados hiperexpressos e 126 hipoexpressos nas condições de co-cultura. A variação da expressão gênica foi de 2 a 7,15 vezes.

A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado, utilizando a expressão diferencial destes 249 genes, foi capaz de classificar corretamente os fibroblastos provenientes de linfonodos comprometidos co-cultivados com células epiteliais mamárias malignas MDA-MB-231, em relação a fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos isolados em cultura (Figuras 21A, 21B e 21C).

Considerando-se os genes diferencialmente expressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos co-cultivados com células MDA-MB-231, algumas das categorias funcionais significativamente moduladas, de acordo com a sua representação na plataforma de cDNA microarray utilizada neste trabalho, foram: metabolismo de lipídios, metabolismo de aminoácidos, biossíntese de ácidos graxos, transporte de prótons, transporte intra-Golgi, transporte retrógrado do Golgi para ER, excreção, regulação da forma celular e glicosilação N-linked. As demais categorias funcionais significativamente

moduladas nesta condição de co-cultura podem ser observadas na Tabela 10 em anexos.

Dentre todas as categorias funcionais significativamente moduladas, encontram-se funções que foram reguladas exclusivamente nestes fibroblastos de linfonodos comprometidos por influência de fatores solúveis derivados da célula MDA-MB-231: metabolismo de aminoácidos, transporte de ânions, reparo de excisão de base, transporte endossomal, excreção, transporte intra-Golgi, biossíntese de lipídios, transporte de elétrons mitocondriais: NADH para ubiquitina, secreção de proteínas, biossíntese de nucleotídeo purina, regulação da forma celular, resposta à proteína “unfolded” e transporte de tetraciclinas (<http://vortex.cs.wayne.edu>).

Estes genes estão envolvidos, segundo a sua anotação ontológica em processo biológicos, em: processos fisiológicos celulares (83,33%), metabolismo (60%), localização (31,33%), regulação de processos celulares (22,67%), regulação de processos fisiológicos (21,33%), entre outras, ou não classificados (Tabela 11).

Dentre os 123 genes hipexpressos em fibroblastos originários de linfonodos comprometidos quando cocultivados com as células epiteliais MDA-MB-231, em relação aos mesmos fibroblastos mantidos isoladamente em cultura, observamos que 40 genes foram regulados apenas pela presença da MDA-MB-231, isto é, somente nestas condições de co-cultura. Dois destes genes apresentaram variação superior a três vezes (ACLY e AXUD1). Estes genes foram classificados de acordo com a sua anotação ontológica e tiveram a seguinte distribuição: metabolismo (34,78%), processos fisiológicos celulares (47,83%), comunicação celular (39,13%), morfogênese (8,7%), etc. (Tabela 7B)

Dentre os 126 genes hipoexpressos, 22 genes foram exclusivamente modulados em fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos mantidos na presença de células MDA-MB-231 em relação aos mesmos fibroblastos isolados, sendo que dois deles sofreram variação maior que três vezes (CLCN5 e PDE6D). Estes genes foram classificados de acordo com a sua anotação ontológica e tiveram a seguinte distribuição: metabolismo (57,14%), processos fisiológicos celulares (28,57%), comunicação celular (14,29%), processos fisiológicos organismal (21,43%), resposta a estímulo (28,57%), etc. (Tabela 7B)

Figura 21A: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) 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 (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos em cultura isoladamente. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada dos fibroblastos de co-cultura daqueles fibroblastos mantidos isolados. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

Figura 21B: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) 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 (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos em cultura isoladamente. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada dos fibroblastos de co-cultura daqueles fibroblastos mantidos isolados. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

Figura 21C: Agrupamento hierárquico não supervisionado de 3 amostras (ensaio em duplicata) 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 (ensaio em duplicata) de fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos em cultura isoladamente. Utilizando-se a expressão gênica diferencial, houve uma separação adequada dos fibroblastos de co-cultura daqueles fibroblastos mantidos isolados. As variações de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

4.13 Perfil gênico de fibroblastos originários de linfonodos não comprometidos mantidos na presença de células epiteliais mamárias.

Alguns genes foram comumente modulados em fibroblastos originários de linfonodos não comprometidos mantidos na presença de células epiteliais mamárias normais (MCF10A) ou malignas (MDA-MB-231) (diagramas de Venn D e E).

Vinte e dois genes foram hiperexpressos em fibroblastos originários de linfonodos não comprometidos nas condições de co-cultura com células MCF10A e MDA-MB-231, em relação aos mesmos fibroblastos mantidos isoladamente em cultura. Estes genes estão envolvidos em metabolismo (70%), processos fisiológicos celulares (60%), comunicação celular (40%), e resposta a estímulo (20%). Quatro genes apresentaram variação da expressão superior a três vezes, incluindo dois, cuja variação foi superior a cinco vezes (em ambas as condições de co-cultura): PM2-ST0303-002-E07 e PRO1073 (Tabela 12).

Cinquenta e sete genes mostraram-se hipoexpressos em fibroblastos originários de linfonodos não comprometidos quando co-cultivados com qualquer das duas linhagens epiteliais, em relação aos mesmos fibroblastos mantidos isoladamente em cultura. Estes genes foram classificados de acordo com a sua anotação ontológica em metabolismo (76%), comunicação celular (21%), processos fisiológicos celulares (21%), processos fisiológicos de regulação (18,42%), resposta a estímulo (13,16%). Quinze destes genes sofreram variação de expressão superior a 3 vezes, em ambas as condições de co-cultura, incluindo MRPL22, cuja variação foi superior a 5 vezes (Tabela 12).

Diagramas de Venn D e E: Número de genes modulados em fibroblastos derivados de linfonodos não comprometidos (n-iLNFb) em co-cultura com células epiteliais mamárias normais e malignas (MCF10A e MDA-MB-231). Número de genes hiperexpressos são representados no diagrama superior e de genes hipoexpressos no diagrama inferior.

4.14 Perfil gênico de fibroblastos originários de linfonodos comprometidos mantidos na presença de células epiteliais mamárias

Alguns genes foram comumente modulados em fibroblastos originários de linfonodos comprometidos mantidos na presença de células epiteliais mamárias normais (MCF10A) ou malignas (MDA-MB-231) (diagramas de Venn F e G).

Oitenta e um genes foram hiperexpressos em fibroblastos provenientes de linfonodos comprometidos nas condições de co-cultura com células MCF10A e MDA-MB-231, em relação aos mesmos fibroblastos isolados. Estes genes estão envolvidos em metabolismo (68%), processos fisiológicos celulares (36%), comunicação celular (23,4%), resposta a estímulo (17%). Catorze genes apresentaram variação em fibroblastos em co-cultura com células epiteliais superior a três vezes, incluindo COTL1, cuja variação foi superior a cinco vezes (em ambas as condições de co-cultura) (Tabela 13).

Noventa e cinco genes mostraram-se hipoexpressos em fibroblastos originários de linfonodos comprometidos quando co-cultivados com qualquer das duas linhagens epiteliais, em relação aos mesmos fibroblastos mantidos isoladamente em cultura. Estes genes foram classificados de acordo com a sua anotação ontológica em metabolismo (60,38%), processos fisiológicos celulares (49,06%), comunicação celular (18,87%), processos fisiológicos de regulação (16,98%), resposta a estímulo (13,21%). Quinze destes genes sofreram variação de expressão superior a 3 vezes, incluindo LOC84661, METTL3, NY-REN-41, cuja variação foi superior a 5 vezes (Tabela 13).

Diagrama de Venn F e G: Número de genes modulados em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos (iLNFb) em co-cultura com células epiteliais mamárias normais e malignas (MCF10A e MDA-MB-231). Número de genes hiperexpressos são representados no diagrama superior e de genes hipoexpressos no diagrama inferior.

4.15 Genes modulados em fibroblastos originários de linfonodos após co-cultura com células epiteliais mamárias

É interessante observar que 18 genes foram modulados em quaisquer fibroblastos obtidos de linfonodos de pacientes com câncer de mama (comprometidos ou não), cultivados na presença de células epiteliais mamárias (normais ou malignas), em comparação aos mesmos fibroblastos cultivados isoladamente (diagramas de Venn H e I).

Apenas um gene (TRIO) foi hiperexpresso em fibroblastos de linfonodos comprometidos ou não comprometidos após co-cultura com as células epiteliais MCF10A ou MDA-MB-231, isto é, em todas as condições de co-cultura. Este gene está envolvido em metabolismo e comunicação celular, de acordo com a sua anotação ontológica em processos biológicos (Tabela 14).

Dezessete genes foram hipoexpressos em fibroblastos originários de linfonodos comprometidos ou não comprometidos após co-cultura com as células epiteliais mamárias MCF10A ou MDA-MB-231, em relação aos mesmos fibroblastos mantidos isolados em cultura. Cinco dos dezessete genes (FLJ11151, LOC84661, MRPS21, NOLA3, TMSBAY) apresentaram variação de expressão maior que 3 vezes entre todas as co-culturas de fibroblastos e células epiteliais em relação a fibroblastos mantidos isoladamente. Segundo sua classificação ontológica, estes 17 genes estão envolvidos em metabolismo (80%), comunicação celular (18,18%), processos fisiológicos celulares (27,27%), processos fisiológicos de regulação (18,18%) (Tabela 14).

Diagrama de Venn H e I: Número de genes modulados em fibroblastos de linfonodos (n-iLNFB e iLNFB) em co-cultura com células epiteliais mamárias (MCF10A e MDA-MB-231). Número de genes hiperexpressos são representados no diagrama superior e de genes hipoeexpressos no diagrama inferior. Estes genes foram regulados em todas as quatro condições de co-cultura.

Tabela 14: Genes diferencialmente expressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos e não comprometidos após co-cultura células epiteliais mamárias (MCF10A e MDA-MB-231) Estes genes foram comumente modulados em fibroblastos de linfonodos por influência de ambos os tipos de células epiteliais mamárias

Gene Hiperexpresso em Fibroblastos de linfonodos co-cultivados com células epiteliais	Genes Hipoexpressos em Fibroblastos de linfonodos co-cultivados com células epiteliais	
TRIO	C6orf170	DKFZP434F091
	FLJ11151	GTF2A2
	HELSNF1	LAF4
	LGTN	LOC84661
	MMP1	MRPS21
	NOLA3	NUDT5
	PCTK3	PGCP
	SKP1A	TMSB4Y
	XTP7	

4.16 Determinação por RT-PCR quantitativo da expressão de genes considerados diferencialmente expressos, em ensaios de cDNA microarrays, em fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos, mantidos isoladamente em cultura.

Para confirmar as expressões gênicas diferenciais encontradas entre fibroblastos de linfonodos comprometidos e não comprometidos, nos ensaios de cDNA microarrays, aumentamos o número de amostras destes fibroblastos, obtidos de diferentes pacientes com câncer de mama, que foram cultivadas isoladamente e recuperadas em três passagens consecutivas.

Foram, então, determinadas por RT-PCR quantitativo a expressão de dez genes encontrados diferencialmente expressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos (4 hiperexpressos e 6 hipoexpressos) em ensaios de cDNA microarrays.

A quantificação dos quatro genes considerados hiperexpressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos em relação aos fibroblastos de linfonodos não comprometidos, mostrou uma maior expressão dos genes *PGBD3* ($p=0,026$) e *PTBP2* ($p=0,049$), como também uma tendência a um aumento na expressão dos genes *HEG* ($p= 0,054$) e *ARRDC3* ($p=0,097$) em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos mantidos isoladamente em cultura (Tabela 15) (Figura 22).

Tabela 15 – Quantificação por RT-PCR em tempo real da expressão de genes considerados hiperexpressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos (iLNFb) em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos (n-iLNFb) em ensaios de cDNA microarrays. *n*: número de amostras analisadas; *DP*± desvio padrão; *p**: teste estatístico de Mann-Witney

Gene	iLNFb		n-iLNFb	
	n	Media± DP	n	Media± DP
PGBD3	10	0.26±0.12	8	0.16±0.08
PTBP2	13	1.93±1.27	11	0.21±0.52
HEG	14	2.59 ±1.12	14	1.89±0.43
ARRDC3	14	0.86 ±0.76	15	0.45±0.17

A quantificação por PCR em tempo real dos seis genes (AKAP8L, BCS1L, C14orf109, TRAPPC1, LOC51035 e MRPL22) considerados hipoexpressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos, em

relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos, em ensaios de cDNA microarrays, mostrou uma maior expressão do gene TRAPPC1 ($p=0,022$), enquanto que os outros genes não tiveram suas variações de expressão consideradas significativas (Tabela 16).

Tabela 16 – Quantificação por RT-PCR em tempo real da expressão de genes considerados hipoexpressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos (iLNFb) em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos (n-iLNFb) em ensaios de cDNA microarrays. *n*: número de amostras analisadas; *DP*± desvio padrão; *p**: teste estatístico de Mann-Witney

Gene	iLNFb		n-iLNFb		p
	n	Media± DP	n	Media± DP	
BCS1L	11	3.15±1.8	14	2.43±1.08	0.35
TRAPPC1	14	3.85±1.22	15	2.87±0.58	0.022
MRPL22	13	2.18±1.08	14	1.85±0.53	0.50
AKA8L	7	0.21±0.257	11	0.21±0.23	0.49
LOC51035	11	0.23 ±0.11	15	0.32±0.30	0.98
C14orf109	12	1.42±1.16	12	0.74±0.27	0.073

Figura 22. Expressão gênica diferencial de PGBD3, PTBP2, HEG e ARRDC3 em fibroblastos de linfonodos comprometidos e não comprometidos, de 10 diferentes pacientes com câncer de mama (5 amostras de n-iLNFB e 5 amostras de iLNFB). Amostras celulares de três passagens consecutivas foram analisadas em três ensaios independentes por RT-PCR quantitativo. O box plot apresenta a distribuição de todos os valores entre barras (quartis 25, 50 e 75 dentro da caixa), exceto valores extremos ($^{\circ}1.5-3.0$ vezes a dimensão da caixa do percentil 75, e * valores mais que 3 vezes a dimensão da caixa do percentil 75). Foi usado o teste Mann Whitney e considerou-se diferencialmente expressos genes onde $p \leq 0.05$. iLNFB: Fibroblastos de linfonodos comprometidos; n-iLNFB: Fibroblastos de linfonodos não comprometidos.

Figura 23. Expressão gênica diferencial de BCS1L, TRAPPC1 e MRPL22 em fibroblastos de linfonodos comprometidos e não comprometidos, de 10 diferentes pacientes com câncer de mama (5 amostras de n-iLNFB e 5 amostras de iLNFB). Amostras celulares de três passagens consecutivas foram analisadas em três ensaios independentes por RT-PCR quantitativo. O box plot apresenta a distribuição de todos os valores entre barras (quartis 25, 50 e 75 dentro da caixa), exceto valores extremos ($^{\circ}1.5-3.0$ vezes a dimensão da caixa do percentil 75, e * valores mais que 3 vezes a dimensão da caixa do percentil 75). Foi usado o teste Mann Whitney e considerou-se diferencialmente expressos genes onde $p \leq 0.05$. iLNFB: Fibroblastos de linfonodos comprometidos; n-iLNFB: Fibroblastos de linfonodos não comprometidos

Figura 24. Expressão gênica diferencial de AKP8L, LOC51035 e c14orf109 em fibroblastos de linfonodos comprometidos e não comprometidos, de 10 diferentes pacientes com câncer de mama (5 amostras de n-iLNFB e 5 amostras de iLNFB). Amostras celulares de três passagens consecutivas foram analisadas em três ensaios independentes por RT-PCR quantitativo. O box plot apresenta a distribuição de todos os valores entre barras (quartis 25, 50 e 75 dentro da caixa), exceto valores extremos ($^{\circ}1.5-3.0$ vezes a dimensão da caixa do percentil 75, e * valores mais que 3 vezes a dimensão da caixa do percentil 75). Foi usado o teste Mann Whitney e considerou-se diferencialmente expressos genes onde $p \leq 0.05$. iLNFB: Fibroblastos de linfonodos comprometidos; n-iLNFB: Fibroblastos de linfonodos não comprometidos

5. Discussão

A maioria dos estudos sobre câncer de mama aborda características e comportamento das células epiteliais malignas, mas pouco se sabe acerca das interações entre células epiteliais e estromais no desenvolvimento do tumor. Além disso, apesar de alguns autores terem analisado aspectos desta interação no sítio primário do tumor, as interações que ocorrem entre células epiteliais e estromais no microambiente linfonodal são menos conhecidas.

Nosso objetivo foi avaliar a taxa de proliferação e o perfil gênico de fibroblastos de linfonodos de pacientes com câncer de mama e determinar a influência de fatores solúveis derivados de células epiteliais mamárias na expressão gênica destes fibroblastos.

A expressão de vimentina e actina de músculo liso em fibroblastos de linfonodos comprometidos ou não comprometidos, assim como o ritmo de proliferação destas células em cultura, nos indicam que os mesmos apresentam comportamento semelhante. Em glândulas mamárias normais não se observa a expressão de actina de músculo liso em fibroblastos estromais, entretanto, em carcinomas invasivos, esta é uma observação comum (Yazhou *et al.*, 2004; Chauhan *et al.*, 2003; Lazard *et al.*, 1993). Nós avaliamos fibroblastos obtidos de linfonodos de pacientes com câncer de mama, neste caso é difícil determinar se este linfonodo axilar é ou não reativo, pois este faz parte do sistema de drenagem linfática do sítio primário do tumor.

O comprometimento linfonodal é o fator prognóstico mais importante em cânceres de mama, entretanto não se sabe ainda quais fatores estão envolvidos no desenvolvimento do tumor neste sítio, e os fibroblastos do linfonodo podem ter um papel significativo neste processo.

Para avaliar este aspecto, estabelecemos a cultura primária de fibroblastos de linfonodos comprometidos e não comprometidos e analisamos se existiam variações na expressão gênica destas células que pudessem estar associadas ao desenvolvimento tumoral em alguns, mas não em outros linfonodos. Para realizar a cultura primária dos fibroblastos, selecionamos linfonodos de cinco pacientes com câncer de mama sem comprometimento linfonodal e de outras cinco pacientes com comprometimento linfonodal, sendo que todos os tumores primários destas pacientes expressaram receptores hormonais (ER e/ou PR) e dois destes tumores de pacientes com linfonodos comprometidos expressaram ErbB2.

Apesar de carcinomas mamários lobulares e ductais invasivos serem tratados de modo similar, relatam-se certas particularidades entre estes tipos de tumores não somente a nível histológico. Uma maior proporção de carcinomas lobulares expressa receptores hormonais, entretanto a taxa de resposta à quimioterapia neoadjuvante é menor que a observada em carcinomas ductais (Cristofanilli *et al.*, 2005). Além disso, a expressão de E-caderina está ausente na histologia lobular, enquanto a amplificação de ErbB2 parece mais freqüente na histologia ductal (Soomro *et al.*, 1991). Apesar disto, somente sutis diferenças foram identificadas no perfil gênico entre tumores ductais e lobulares (Korkola *et al.*, 2003). Estas características foram relatadas no tumor primário, entretanto, não há como avaliar, até o momento, se ocorre

uma influência específica de células malignas de histologia lobular ou ductal no linfonodo. Relata-se também um perfil gênico associado à expressão tumoral de receptores hormonais (Nagai *et al.*, 2004). Neste caso, também é difícil prever se características específicas de células malignas sejam elas ER+/PR+ ou ER-/PR- exercem influência distinta no microambiente linfonodal.

Analizamos 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.

Neste trabalho utilizamos a plataforma de cDNA microarray (4.8K002) que tem como característica principal o uso da tecnologia ORESTES (“Open Reading Frame Expressed Sequence Tags”) que privilegia a parte central das moléculas de mRNA contendo o “quadro aberto de leitura”, tendo sido estas seqüências obtidas de vários tipos de tumores humanos, em oposto às outras estratégias que têm como alvo até a região terminal 5’ – 3’ não codificadora (Brentani *et al.*, 2005), o que a distingue de outras plataformas de cDNA microarrays.

Observamos que fibroblastos de linfonodos, sejam eles comprometidos ou não, são células que guardam características semelhantes entre si, pois encontramos somente 13 genes (0,28%) diferencialmente expressos, sendo quatro hiperexpressos (*PTBP2*, *HEG*, *ARRDC3* e *PGBD3*) e nove hipoexpressos (*AKAP8L*, *COPS5*, *BCS1L*, *PSMA5*, *C14orf123*, *C14orf109*, *TRAPPC1*, *LOC51035* e *MRPL22*).

Para confirmar se alguns destes genes seriam regulados especificamente em fibroblastos de linfonodos comprometidos, 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 três passagens celulares sucessivas e a tecnologia de RT-PCR em tempo real.

Dentre os genes considerados hiperexpressos em fibroblastos oriundos de linfonodos comprometidos em relação aos não comprometidos pelo ensaio de cDNA microarray, observamos por RT-PCR em tempo real uma maior expressão dos genes *PTBP2* e *PGBD3* e uma tendência à hiperexpressão dos genes *HEG* e *ARRDC3*, sugestivos de concordância dos resultados.

O gene *PTBP2* (Polypyrimidine tract binding protein 2), localização 1p21, codifica um fator nuclear que se liga à região de polipirimidinas do pré-mRNA e está associado com o silenciamento de éxons (Rahman *et al.*, 2004; Markovtson *et al.*, 2000). Jin *et al.*, (2000) demonstraram uma maior expressão de *PTBP2* em glioblastomas multiformes em relação ao tecido normal adjacente. *PTBP2* pode mediar a exclusão de exons de vários genes, entre eles *FGFR1* (Receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos), onde, através de interação específica com o elemento regulatório ISS-1, resulta exclusão do exon alfa do transcrito de RNA, originando preferencialmente isoforma *FGFR1β*, que apresenta maior afinidade por FGF1 e FGF2, podendo conferir vantagem na proliferação. Estes estudos corroboram nossos resultados, que mostram uma modulação positiva deste gene em fibroblatos de linfonodos comprometidos em relação aos fibroblastos de linfonodos não comprometidos, indicando que este gene possa ser importante durante o desenvolvimento de metástases regionais em pacientes com câncer de mama.

Além disso, também encontramos hiperexpresso em fibroblastos de linfonodos comprometidos o gene *PGBD3* (PiggyBac transposable element derived 3), localização 10q11, que codifica uma família de proteínas que

podem estar relacionadas às transposases, enzimas que catalizam a clivagem e a transferência de fita do DNA (Strausberg *et al.*, 2002; Feschotte *et al.*, 2005). Embora tenhamos poucas informações sobre este gene, relata-se que os elementos transposases possuem funções que podem ser relacionadas às alterações genéticas encontradas em células cancerosas (Hauptmann & Schmitt), como a sua habilidade para induzir alterações em larga escala na estrutura, tamanho e organização do genoma. Elementos transposases induzem rearranjos cromossômicos, assim como deleções, duplicações, formação de pseudogenes, transdução, embaralhamento de exons, inversões e translocações, levando a alterações de pequena para grande escala, como acontece no genoma da célula cancerosa. Existem evidências que ligam a atividade dos elementos transposases à metilação. Padrões anormais de metilação do DNA são frequentemente observados em células cancerosas, permitindo o início da ativação destes elementos. Alguns estudos mostram a hipometilação de seqüências L1 de retrotransposos em carcinomas uroteliais e hepatocelulares e câncer colorretal (Flort *et al.*, 1999; Takai *et al.*, 2000; Suter *et al.*, 2004). Portanto, a hiperexpressão de PGBD3 em fibroblastos de linfonodos comprometidos nos sugere que este elemento transposase possa estar ativado nestes fibroblastos por influência da célula epitelial cancerosa, que pode ter causado alguma instabilidade genética nestas células, contribuindo para a adaptação da célula cancerosa no microambiente linfonodal.

Também encontramos uma tendência à hiperexpressão dos genes *HEG* e *ARRDC3*. O gene *HEG* (Heg homolog), localização 3q21.2, codifica uma proteína transmembrana essencial para o padrão normal do desenvolvimento (Mably *et al.*, 2003). O gene *ARRDC3* (arrestin domain containing 3),

localização 5q14.3, codifica uma proteína sem função definida, que contém domínio arrestina. A arrestina pertence a uma família de proteínas conhecidas por estarem envolvidas na regulação de receptores acoplados à proteína G. Girnita *et al.*, (2005) demonstraram que membros desta família, β -arrestina 1 e 2 são importantes para a ubiquitinação e modulação negativa do receptor 1 do Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R), atuando como adaptador que liga a oncoproteína ligase E3 MDM2 ao IGF-1R, apontando para uma função no crescimento celular e câncer. Além disso, Ge *et al.*, (2004) relataram que a migração de células mamárias cancerosas MDA-MB-231 mediada por PAR-2 (Receptor 2 Ativado por Protease) requer β -arrestina 1 e 2, e ainda que a ativação autócrina de PAR-2 por proteases secretadas por células cancerosas pode contribuir para a migração das células tumorais metastáticas através da ativação de ERK1/2 dependente de β -arrestina. Em um estudo recente, Buchanan *et al.*, (2006) mostraram a importância da β -arrestina 1 na progressão metastática do câncer colorretal.

Dentre os nove genes classificados inicialmente, em cDNA microarrays, como hipoexpressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos em relação aos não comprometidos, seis foram selecionados para serem avaliados por RT-PCR em tempo real, porém não observamos modulação de nenhum destes genes, exceto *TRAPPC1* que se mostrou mais expresso em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos em relação a fibroblastos derivados de linfonodos não comprometidos em ensaios de RT-PCR. Entretanto, se considerarmos a expressão de *TRAPPC1* apenas nas seis amostras de fibroblastos de linfonodos comprometidos versus fibroblastos de linfonodos não comprometidos, as quais foram usadas inicialmente nos ensaios de cDNA

microarrays, também não detectamos variação da expressão deste gene nas análises de RT-PCR.

TRAPPC1 (Trafficking protein particle complex 1) codifica uma proteína transportadora de partículas pertencente a um complexo multiproteico envolvido no transporte do retículo endoplasmático para o Golgi e intra Golgi. Entretanto, a localização subcelular, bem como a função dos diversos componentes da família TRAPP, ainda permanecem desconhecidas (Kim *et al.*, 2005), de maneira que ainda não é possível estabelecer uma relação esclarecedora sobre a modulação positiva ou negativa deste gene em fibroblastos de linfonodos comprometidos.

Alguns autores têm mostrado correlações variadas entre as técnicas de cDNA microarrays e qRT-PCR, utilizando as mesmas amostras em ambos os ensaios. Wang *et al.* (2006) analisaram a expressão gênica de amostras de tecido cerebral, pulmonar e hepático em duas diferentes plataformas de cDNA microarray e também por RT-PCR utilizando alíquotas das mesmas amostras em todos os ensaios. Estes autores avaliaram a expressão de 1.375 genes e encontraram uma correlação perfeita de 34 - 40% entre os ensaios de PCR e cDNA microarrays e ainda anti-correlações de 6,3 - 9,6% dos genes analisados. Em um outro estudo, Folgueira *et al.*, (2005) avaliaram o perfil de expressão gênica em cânceres de mama, utilizando também duas plataformas de cDNA microarrays diferentes e ao determinar por RT-PCR a expressão de alguns genes selecionados observaram correlação significativamente positiva de 50-62,5% entre os ensaios. Em amostras de leucemias e de tumor cerebral, a correlação entre os ensaios de cDNA microarray e PCR na determinação da expressão gênica foi de 67-69% dos genes alvo (Dallas *et al.*, 2005).

Em outros estudos, onde foram realizadas validações biológicas da expressão gênica diferencial identificada nos ensaios de cDNA microarray, utilizando-se um outro grupo de amostras para análise em ensaios de RT-PCR, como foi realizado neste trabalho, a concordância encontrada também foi 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. Análise de um novo grupo de amostras por ensaios de RT-PCR mostrou uma concordância na expressão diferencial de 40% destes genes. Também utilizando diferentes amostras, um estudo recente usando células BHK-21 infectadas por vírus da dengue demonstrou 53% de concordância em seus resultados de expressão gênica avaliada pelas duas técnicas (Liew *et al.*, 2006), sendo que 27% dos genes apresentou variação contrária em determinações por cDNA microarray versus RT-PCR. Comparando diferentes grupos de amostras de pacientes com câncer de mama EC III em relação a tecido mamário normal, Folgueira *et al.*, (2006) verificaram concordância da expressão diferencial de 4 em 6 genes analisados por cDNA microarray e RT-PCR. Além disso, Perreard *et al.* (2006) selecionaram genes analisados em estudos prévios por cDNA microarrays e cuja expressão caracterizou subtipos moleculares de câncer de mama que são importantes para prognóstico e tratamento. Estes autores realizaram um estudo prospectivo com amostras mamárias e linhagens de câncer de mama e encontraram uma altíssima correlação (93%) de expressão entre qRT-PCR e as assinaturas dos cDNA microarrays.

O uso de cDNA microarray é uma técnica que permite avaliar a expressão gênica global e permite o rastreamento do perfil gênico das

amostras, entretanto, um melhor entendimento das limitações desta tecnologia nos ajudará a determinar sua aplicação e na interpretação destes resultados. Uma limitação no uso de cDNA microarrays consiste na significativa diminuição de 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). Um outro fator que pode contribuir para uma alta ou baixa correlação entre as técnicas de RT-PCR e cDNA microarray é a diferença nos desenhos das sondas para o array e a PCR. Esta diferença pode resultar na quantificação de diferentes transcritos, como por exemplo, produtos de splicing alternativo ou degradação, alterando medidas absolutas como taxas de, falsos positivos e anti-correlação.

Neste estudo, as diferenças de expressão gênica encontradas entre amostras de fibroblastos de linfonodos obtidos de uma mesma paciente, não devem ter sido causadas por condições de cultura ou lote de soro, pois foram utilizadas as mesmas condições de cultura e o mesmo lote de soro em todos os ensaios. Estas diferenças também não devem ser de diferentes passagens celulares em cultura, pois os fibroblastos utilizados nestes ensaios encontravam-se ainda em passagens precoces de cultivo, da terceira à décima passagem. A análise da expressão gênica diferencial destes fibroblastos de linfonodos em um maior número de amostras provavelmente eliminaria variações resultantes de particularidades de uma pequena amostragem.

Observamos a expressão de actina de músculo liso em ambos os tipos de fibroblastos, uma reconhecida característica de miofibroblastos (Kalluri *et al.*, 2006), de maneira que a caracterização imunocitoquímica e o ritmo de proliferação destas células corroboram os nossos dados de cDNA microarray e

RT-PCR que nos indicam que fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos ou não comprometidos de pacientes com câncer de mama são células com perfil de expressão gênica similares. Além disso, nossos resultados sugerem que o desenvolvimento do tumor neste sítio não pode ser atribuído a diferenças específicas de expressão gênica destes fibroblastos.

Frente a esta expressão diferencial, é difícil afirmar se algum processo ou via de sinalização está ativado ou reprimido em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos.

Entretanto, observamos que sete, dos nove genes hipoexpressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos em relação aos não comprometidos, também foram hipoexpressos em fibroblastos obtidos de linfonodos não comprometidos quando co-cultivados com células epiteliais MCF10A, sendo que três destes, também foram hipoexpressos quando em co-cultura com células MDA-MB-231, em relação à cultura isolada de fibroblastos de linfonodos não comprometidos. Somente dois genes, *AKAP8L* e *C14orf109*, foram exclusivamente diferencialmente expressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos em relação aos não comprometidos, isto é, não sofreram influência em co-cultura das células epiteliais mamárias normais ou malignas.

Encontramos quatro genes hiperexpressos (*ARRDC3*, *HEG*, *PGBD3* e *PTBP2*) em linfonodos comprometidos em relação aos não comprometidos, sendo que o gene *ARRDC3* foi modulado positivamente em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivados com a célula MCF10A e o gene *PGBD3* também foi modulado positivamente em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivados com MDA-MB-231. A presença da célula epitelial

parece modificar a expressão de alguns genes em fibroblastos de linfonodos não comprometidos.

Após compararmos o fenótipo destes fibroblastos de linfonodos obtidos de pacientes com câncer de mama, voltamos a nossa atenção para as interações ocorridas entre estes fibroblastos e as células epiteliais mamárias durante o período em co-cultura.

Detectamos algumas variações no perfil de expressão gênica dos fibroblastos de linfonodos quando em co-cultura com células epiteliais mamárias normais ou malignas, sugerindo que estas células secretam fatores solúveis que influenciam a expressão gênica de fibroblastos. Quando os fibroblastos foram mantidos em co-cultura com células epiteliais, o número de genes diferencialmente expressos em relação a fibroblastos mantidos isoladamente, variou de 3,28 a 7,85% dos genes analisados na lâmina de cDNA microarrays.

Também observamos que as células epiteliais normais e malignas (MCF10A e MDA-MB-231) regularam a expressão de um maior número de genes em fibroblastos de linfonodos comprometidos (cerca de 2,2 vezes), em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos que também foram mantidos em co-cultura.

É interessante notar que as células epiteliais (MCF10A ou MDA-MB-231) tendem a regular negativamente a expressão gênica de fibroblastos de linfonodos não comprometidos (64,9 a 68,3% dos genes diferencialmente expressos). O mesmo não ocorre com fibroblastos de linfonodos comprometidos quando co-cultivados com células epiteliais, pois a mesma proporção de genes são regulados tanto positiva quanto negativamente.

Quanto aos transcritos de fibroblastos (tanto de linfonodos comprometidos como de não comprometidos) regulados exclusivamente por uma das linhagens epiteliais, observamos que células MCF10A tendem a exercer influência na expressão de maior número de genes que células MDA-MB-231. É interessante considerar que células epiteliais normais não se encontram em linfonodos não comprometidos “in vivo”, entretanto, as análises dos genes diferencialmente expressos nas condições de co-cultura com a célula MCF10A foram muito importantes para que pudéssemos separar e investigar com mais atenção aqueles genes e categorias funcionais modulados exclusivamente por influência de fatores solúveis liberados por uma célula cancerosa.

Apesar de não termos identificado grandes diferenças de expressão gênica entre fibroblastos provenientes de linfonodos comprometidos em relação aos oriundos de linfonodos não comprometidos, cerca de 2% dos genes foram regulados exclusivamente pela presença de células epiteliais cancerosas. Deste modo, células MDA-MB-231 regularam a expressão de 0,91% dos genes de fibroblastos obtidos de linfonodos não comprometidos e 1,32% dos genes de fibroblastos provenientes de linfonodos comprometidos. Observamos que, curiosamente, estes genes foram modulados somente em uma condição de co-cultura, sugerindo-nos que possam existir alguns genes que são preferencialmente regulados em uma situação específica.

A análise das categorias funcionais significativamente moduladas apenas em fibroblastos de linfonodos não comprometidos por influência da célula MDA-MB-231, entre as quais encontramos resposta de defesa celular, reparo de quebra de dupla fita, indução de apoptose por sinalização extracelular, regulação positiva da transcrição, resposta a estímulos de quebra

do DNA, resposta à peste, patógeno ou parasita e processamento de rRNA, nos leva a pensar sobre a possibilidade de que estes fibroblastos de linfonodos não comprometidos desenvolvam algum tipo de resposta primária quando entram em contato com fatores solúveis derivados da célula cancerosa.

As vias de sinalização do cálcio, da insulina, do hormônio liberador de gonadotrofina e da regulação do citoesqueleto de actina foram significativamente moduladas em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivados com as células MDA-MB-231. Na via de sinalização do cálcio encontramos a modulação positiva do gene *FGFR2* e a regulação negativa dos genes *CALM2* e *CALM3*. Vários estudos têm mostrado que a desregulação da sinalização do cálcio intracelular, via expressão e/ou função alterada de seus transportadores, canais e proteínas ligantes, pode contribuir para a patofisiologia do câncer de mama (Lee *et al.*, 2006). A ativação de *FGFR* pode ativar a via de influxo do cálcio, regulando a atividade de subgrupos de proteínas quinases ou calmodulinas (Archer *et al.*, 1999). Dyaz *et al.*, (2002) mostraram que isoformas de FGF ativam o sistema de sinalização de IP_3 - Ca^{2+} através da fosforilação de fosfolipase $C\gamma 1$ ($PLC\gamma 1$), atuam na sinalização de MAPK e podem promover indução na diferenciação mesodermal. Em um outro estudo, Biswas *et al.*, (1998) relatam que as calmodulinas possuem um papel auxiliar na transativação gênica mediada pelo receptor de estrógeno. Rodrigues-Mora *et al.*, (2005), mostraram que quinases dependentes de cálcio/calmodulinas (CAM-K) participam do controle da progressão do ciclo celular em células de câncer de mama e consequentemente da sua proliferação. Estes autores observaram que o

tratamento de células MCF-7 com inibidores de CAM-K diminuem os níveis de ciclina D1 e promovem parada do ciclo celular na fase G0-G1.

Uma outra via de sinalização celular que apresentou significativa modulação em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivados com MDA-MB-231 foi a via da insulina, onde encontramos a hipoexpressão de genes que codificam a flotilina 1 (*FLOT1*), calmodulinas (*CALM2* e *CALM3*) e a glicogênio fosforilase (*PYGL*). Estudos mostram a cooperação entre insulina, fator I de crescimento semelhante à insulina (*IGF-I*) e estrógeno para estimular a progressão do ciclo celular em células de câncer de mama MCF-7 (Lai et al, 2001; Mawson *et al.*, 2005). Em outro trabalho, Fecchi *et al.*, (2006) demonstraram que em resposta a estímulos de insulina, Flotilina-1 participa da regulação do metabolismo energético de células do músculo esquelético através da regulação espacial e temporal da translocação do Transportador de Glicose Tipo 4 (*GLUT4*), que participa da homeostase da glicose. As Calmodulinas (*CALM2* e *CALM3*) e a glicogênio fosforilase (*PYGL*), são proteínas importantes durante o processo de glicogênese. A regulação desta via parece ser importante em câncer de mama (Sachdev *et al.*, 2001). Em nosso trabalho a célula tumoral parece reduzir a captação de glicose e glicogênese em fibroblastos de linfonodos não comprometidos.

A via de sinalização do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (*GnRH*) é uma reguladora chave do sistema reprodutivo, gerando a síntese e liberação de LH e FSH na pituitária, os quais estimulam a síntese de estrógeno, um conhecido indutor de proliferação de células mamárias. Em células alfa T3-1, derivadas da pituitária e muito utilizadas como modelo para a compreensão desta via, a sinalização de *GnRH* inclui a ativação da cascata de MAPK, que é

fundamental para a transmissão de sinal da superfície celular para o núcleo e na regulação da transcrição da gonadotrofina (Kraus *et al.*, 2001). O *GnRH* também encontra-se expresso em células não-pituitárias, e Chen *et al.*, (2002) descrevem a presença de *GnRH1* e *GnRH2* em células T humanas normais e leucêmicas. Estes autores relatam que *GnRH1* e *GnRH2*, secretados de nervos ou de fontes parácrinas ou autócrinas, interagem diretamente com células T e geram transcrição gênica, adesão, quimiotaxia e entrada em órgãos específicos. Evidências apontam uma importante combinação de Ca^{2+} e proteína quinase C (PKC) na sinalização do GnRH (Naor *et al.*, 1998). É interessante observar que PKC e o influxo de Ca^{2+} têm por sua vez participação na regulação dos genes *CALM2*, *CALM3*, *MAP3K4* e *PLA2G5* que tiveram expressão modulada em fibroblastos de linfonodos não comprometidos quando co-cultivados com células MDA-MB-231.

A via de sinalização que regula o citoesqueleto de actina foi significativamente regulada em fibroblastos de linfonodos não comprometidos quando co-cultivados com os dois tipos de células epiteliais mamárias (MCF10A e MDA-MB-231). Nesta via encontramos alguns genes modulados por ambas as células (*FGFR2*, *ROCK2*, *DIAPH2* e *TMSB4*), genes modulados apenas por influência da célula normal (*HRAS*, *ITGAV*, *crk* e *MYH9*) e ainda um outro gene pertencente à família Rho GTPases (*ARHGEF12*) hiperexpresso somente em co-culturas com a célula cancerosa. A família de proteínas Rho GTPases controlam a formação de protusões (lamelipodia e filopodia) por regulação do citoesqueleto e adesão celular. A polarização e a extensão destas protusões é o evento inicial para a migração celular. *Rac* e *Cdc42* estão envolvidos na formação de lamelipodia e filopodia, respectivamente, e Rho está

envolvido na formação de fibras de estresse e contração. *Rho* regula a fosforilação de miosina através de moléculas efetoras, como Rho-kinase/ROCK/ROK. A regulação coordenada por estes membros da família *Rho* dão início à migração celular (Nakayama *et al.*, 2005; Fukata *et al.*, 2003; Ridley *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 1998).

Dentre os inúmeros genes regulados em fibroblastos de linfonodos não comprometidos pela presença de células epiteliais malignas, alguns foram modulados exclusivamente nesta condição de co-cultura. Deste modo, uma maior ou menor expressão destes genes em fibroblastos de linfonodos não comprometidos pode representar uma influência inicial do câncer no fenótipo destes fibroblastos.

Dentre os 53 genes hiperexpressos em fibroblastos originários de linfonodos não comprometidos quando co-cultivados com células epiteliais malignas, em relação aos mesmos fibroblastos mantidos isoladamente em cultura, 23 genes foram regulados exclusivamente por fatores secretados por células MDA-MB-231, estando relacionados ao transporte vesicular, resposta imune, regulação da transcrição gênica, biossíntese de macromoléculas e catabolismo, entre outros processos. Cinco destes genes (*BET1*, *ENTPD1*, *PHF3*, *SIAT1* e *USP7*) tiveram variação da expressão superior a três vezes, sendo que o gene *BET1* apresentou variação superior a cinco vezes.

BET1 (*BET1* homolog), localização 7q21.1-q22, codifica uma proteína que participa no transporte vesicular do retículo endoplasmático (ER) ao aparato de Golgi (Zhang *et al.*, 1997); *ENTPD1* (Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1), localização 10q24, codifica ATP diphosphohydrolase vascular, que hidroliza ATP, sendo considerado um inibidor de ativação

plaquetária e *PHF3* (PHD finger protein 3), localização 6q12, está relacionado à regulação da transcrição (Fischer *et al.*, 2001).

SIAT1 (Sialyltransferase 1), localização 3q21-q28, codifica uma proteína de membrana tipo II que catalisa a transformação do ácido siálico a substratos contendo galactose. Esta proteína está envolvida na gênese de determinados carboidratos da superfície celular e antígenos de diferenciação da família glicosiltransferase. Aumento da expressão de *SIAT1* foi encontrado em câncer de mama, cólon, cérvix e próstata e a atividade elevada deste gene está ligada a marcadores de pior prognóstico em pacientes com câncer de mama. Alguns estudos mostram que *SIAT1* possui profunda influência no potencial metastático de células tumorais *in vitro* (revisto por Dalziel *et al.*, 2004). É interessante observar que Dalziel *et al.*, (2004) mostraram que a transformação de fibroblastos NIH3T3 com o oncogene H-ras, leva ao acúmulo de transcritos de *SIAT1*, sugerindo que, a interação do fibroblasto com a célula maligna, como observada em nosso modelo, desencadeie processo também ativado pela transformação celular.

USP7 (Ubiquitin-specific protease 7), localização 16p13.3, é uma proteína que estabiliza *p53* na presença de excesso de *MDM2*, ao diminuir sua ubiquitinação (Li *et al.*, (2002). *USP7* também reprime o crescimento celular dependente de *p53* e induz a apoptose, tendo papel de supressor tumoral. É portanto, difícil estabelecer uma relação entre a maior expressão de *USP7* em fibroblastos na presença de células malignas, mas pode-se aventar que células MDA-MB-231 induzam a expressão de um gene supressor de tumor em fibroblastos de linfonodos não comprometidos, na tentativa de reduzir a resposta estromal à sua presença.

Dentre os 18 genes que foram exclusivamente hipoexpressos em fibroblastos obtidos de linfonodos não comprometidos mantidos na presença de células MDA-MB-231 em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos isoladamente, encontram-se três genes que sofreram variação acima de três vezes: *DAPK1*, *ERBB2* e *NCF2*. O gene *DAPK* (Death-associated protein kinase 1), localização 9q34.1, codifica uma proteína mediadora positiva da morte celular programada induzida por Interferon gama. A perda de expressão de *DAPK1* está relacionada a supressão de apoptose e metástase (Inbal *et al.*, 1997), o que nos leva a inferir que a modulação negativa deste gene em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivados com células malignas, tenha sido consequência de uma tentativa da célula cancerosa em subverter esta célula estromal, criando um ambiente favorável para a sua própria sobrevivência.

Curiosamente, um gene conhecido por estar modulado positivamente em tumores primários de mama, foi encontrado hipoexpresso em fibroblastos de linfonodos não comprometidos na presença de células malignas: *ERBB2* (V-Erb-B2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2), localização 17q21.1. Vários autores demonstraram que este gene está hiperexpresso em 25 a 30% dos cânceres de mama e se relaciona a um pior prognóstico da doença (Slamon *et al.*, 2001). Outro gene encontrado hipoexpresso nesta situação de co-cultura foi o *NCF2* (Neutrophil cytosolic factor 2), localização 1q25, que codifica uma proteína componente do complexo NADPH oxidase, cuja expressão em fibroblastos humanos pode contribuir para a geração de superóxidos por estas células (Jones *et al.*, 1997).

Uma situação que muito nos interessou analisar foi a de co-cultura entre fibroblastos de linfonodos comprometidos e células malignas, pois, dentre todas as condições de co-cultura realizadas neste trabalho, esta é a que mais se aproxima do que realmente acontece no microambiente linfonodal “in vivo”. Nesta condição de cocultura também encontramos algumas categorias funcionais de processos biológicos significativamente moduladas apenas por influência da célula MDA-MB-231, entre as quais podemos destacar: metabolismo de aminoácidos, transporte de ânions, reparo de excisão de base, transporte endossomal, excreção, transporte intra-Golgi, biossíntese de lipídios, secreção de proteínas, biossíntese de nucleotídeo purina e regulação da forma celular. Nestas condições de co-cultura, é possível que algumas destas funções significativamente moduladas tenham relação com um tipo de resposta secundária desenvolvida por estes fibroblastos de linfonodos comprometidos, em uma fase da doença em que a micrometástase regional já se encontra estabelecida. No entanto, em nossas análises dos genes modulados em fibroblastos de linfonodos comprometidos por ação das células cancerosas MDA-MB-231 não encontramos vias de sinalização intracelular que tenham sido significativamente moduladas.

Dentre os 123 genes hiperexpressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos na presença de células MDA-MB-231, em relação aos mesmos fibroblastos mantidos isoladamente em cultura, observamos 40 genes regulados especificamente neste tipo de fibroblasto (de linfonodos comprometidos) e apenas pela presença da célula maligna, sendo que dois apresentaram variação superior a três vezes: *ACLY* e *AXUD1*.

O gene *ACLY* (ATP citrate lyase), localização 17q21.1, codifica uma enzima responsável pela síntese da Acetil-CoA citosólica, que atua em várias vias biosintéticas importantes, incluindo lipogênese e colesterogênese (Michno *et al.*, 2004). Análises de cDNA microarray mostraram que *ACLY* está hiperexpresso em cânceres gástricos (Varis *et al.*, 2002). Este gene localiza-se no cromossoma 17 (17q21.1), onde também se localiza o gene que codifica *ErbB2*. Estudos recentes de genômica e de perfil de expressão do cromossoma 17 no câncer de mama têm revelado padrões complexos de alteração neste cromossoma (Orsetti *et al.*, 2004).

O gene *AXUD1* (Axin1 up-regulated), localização 3p22, codifica uma proteína nuclear, cuja expressão é induzida em resposta aos elevados níveis de axina (Ishiguro *et al.*, 2001). Axina regula negativamente a via de sinalização de *WNT* durante a formação axial no desenvolvimento embrionário, possuindo um papel central no controle do crescimento celular e na tumorigênese (Zhang *et al.*, 1999) sendo um importante regulador de beta-catenina. A hiperexpressão de axina pode induzir apoptose em linhagens celulares por ativação de *JNK* e desestabilização de beta-catenina (Neo *et al.*, 2000), entretanto, o papel da maior expressão de *AXUD1* em fibroblastos de linfonodos comprometidos em co-cultura com células MDA-MB-231 não é clara.

Nossos resultados indicam que estes genes regulados positivamente possam estar envolvidos na ativação destes fibroblastos, sendo possível que os mesmos possuam algum importante papel durante o desenvolvimento de micrometástases regionais em pacientes com câncer de mama.

Dentre os 126 genes regulados negativamente em fibroblastos de linfonodos comprometidos em co-cultura com células MDA-MB-231, encontramos 22 genes que foram exclusivamente hipoexpressos em fibroblastos obtidos de linfonodos comprometidos quando mantidos na presença de células MDA-MB-231 em relação aos mesmos fibroblastos isolados, dois deles sofreram variação maior que três vezes (*CLCN5* e *PDE6D*), e estão relacionados ao transporte e à percepção sensorial. O gene *CLCN5* (Chloride channel 5), localização Xp11.22, codifica um membro da família CLC que está envolvido na regulação de voltagem em canais de cloreto (Fisher *et al.*, 1995) e o gene *PDE6D* (Phosphodiesterase 6d, cgmp-specific, rod, delta), localização 2q36-q37, codifica uma proteína que possui um papel na estabilização de dímeros catalíticos das membranas (Florio *et al.*, 1996).

A constatação de que alguns genes de fibroblastos de linfonodos comprometidos ou não comprometidos foram modulados exclusivamente por fatores solúveis liberados pelas células epiteliais mamárias malignas MDA-MB-231, nos leva a considerar sobre a existência de genes modulados especificamente durante as interações entre células epiteliais mamárias e os fibroblastos no microambiente linfonodal, e ainda que estes genes possam estar implicados na indução ou repressão do desenvolvimento de metástases regionais no câncer de mama.

Alguns genes foram diferencialmente expressos por fibroblastos, independente se provenientes de linfonodos comprometidos ou não, quando em co-cultura com células epiteliais (independente se cancerosas ou não), em comparação a fibroblastos cultivados isoladamente, sugerindo que

fatores produzidos por células epiteliais interfiram em sua regulação em fibroblastos.

Apenas um gene foi hiperexpresso em fibroblastos de linfonodos em todas as condições de co-cultura: *TRIO* (triple functional domain ;PTPRF interacting), localização 5p15.1-p14, que codifica uma proteína com três domínios funcionais: um domínio serina/treonina quinase e dois domínios fatores de troca de nucleotídeo guanina (GEF) que promovem troca de GDP por GTP e ativação de GTPases como *RhoA*, *Rac1* e *Cdc42*, os quais controlam processos de organização e remodelação do citoesqueleto de actina, migração celular, proliferação celular por regulação da cascata de sinalização de *MAPK* e transcrição gênica (Debant *et al.*, 1996). Em carcinoma de bexiga, a amplificação de *TRIO* está associada a fenótipo tumoral invasivo, alto grau tumoral e alta proliferação celular, mas não, a pior prognóstico (Zheng *et al.*, 2004). A expressão de domínios específicos de *TRIO* em fibroblastos NIH3T3 leva a um aumento da migração em direção a elementos de matriz como fibronectina, a espraçamento celular mais rápido e proliferação independente de ancoragem (Seipel *et al.*, 1999). Além disso, *TRIO* pode estar envolvido no processo de transformação de células NIH3T3, que são tumorigênicas em camundongos imunodeprimidos e apresentam aumento de invasividade (Yoshizuka *et al.*, 2004). É interessante notar que em nosso modelo de co-cultura, fatores secretados por células epiteliais mamárias, fossem elas de origem cancerosa ou não, levaram à maior expressão de *TRIO* pelos fibroblastos de linfonodos, gene este associado à migração e proliferação celulares, indicando que esta modulação positiva possa estar relacionada à ativação nestes fibroblastos de processos biológicos importantes durante a tumorigênese.

Dezessete genes foram encontrados hipoexpressos por fibroblastos de linfonodos em todas as condições de co-cultura com as células epiteliais. Este dado pode nos indicar que durante as interações heterotípicas ocorridas no microambiente linfonodal, alguns genes em fibroblastos tenham a sua expressão preferencialmente diminuída por ação de fatores solúveis liberados de células epiteliais mamárias. Entre eles encontramos alguns genes envolvidos no controle da transcrição gênica, como *LAF4*, *GTF2A2* e *HELSNF1*. O gene *LAF4* (lymphoid nuclear protein related to AF4), localização 2q11-q12, é um fator de transcrição preferencialmente expresso em tecido linfóide e parece ter função no desenvolvimento linfóide e oncogênese (Hiwatari *et al.*, 2003); *GTF2A2* (fator de transcrição geral IIA, 2, subunidade 12kDa), localização 15q22.2, é um membro do complexo de transcrição da RNA polimerase; o gene *HELSNF1*, localização 14q11.2, codifica uma helicase com domínio 1 SNF2, e que atua na modificação da cromatina, regulando portanto, a transcrição.

Neste grupo incluem-se também genes que controlam o processamento de RNA e tradução, como *MRPS21*, *NOLA3* e *LGTN*. *MRPS21* (proteína mitocondrial ribossomal S21), localização 1q21, encontra-se na subunidade pequena 28S do ribossoma mitocondrial e está envolvida na biossíntese de proteínas na mitocôndria, (Cavdar *et al.*, 2001); *NOLA3* (proteína nucleolar família A, membro 3), localização 15q14-q15, é uma ribonucleoproteína pequena da família H/ACA, cujos membros estão envolvidos no processamento de rRNA e também são componentes do complexo da telomerase, sendo que a depleção de qualquer dos quatro membros desta família causa danos à produção de 18S rRNA (Pogacic *et al.*, 2000); O gene *LGTN* (ligatina),

localização 1q31-q32, codifica um receptor que liga fosfoproteínas e está envolvido em seu tráfego para endossomas e periferia da células, mas também contém domínios que podem estar envolvidos na ligação a RNA e no início do processo de tradução (Jakoi *et al.*, 1999).

Outros genes podem contribuir na regulação do ciclo celular, como *SKP1A* e *PCTK3*. O gene *SKP1A* (proteína 1A associada à quinase de fase S ou proteína p19A associada a CDK2/ciclina A), localização 5q31, liga-se à ciclina F, *SKP2* e outras proteínas do complexo SCF ubiquitina ligase. *SKP1A* tem, portanto, papel na regulação do ciclo celular e de proteólise pelo sistema ubiquitina-proteassoma. *SKP1A* regula o nível celular de *NFκB* e β-catenina e a atividade dos fatores transcricionais *TCF1* e *LEF1* (Bai *et al.*, 1996); *PCTK3* ou *PCTAIRE*, localização 1q31-q32, é uma proteína serina/treonina quinase relacionado a *CDC2/CDC28* (Okuda *et al.*, 1992).

Um resultado intrigante, obtido em nosso modelo em todas as condições de co-cultura com estes fibroblastos de linfonodos, foi à modulação negativa do gene *MMP1* (matrix metalloproteinase 1), localização 11q11-q2, que codifica uma metaloprotease que atua em colágenos I, II e III em cânceres de mama. Em um recente estudo, Boire *et al.*, (2005) mostrou que *MMP1* é liberada por fibroblastos, e não por células cancerosas, e que o meio condicionado por estes fibroblastos possui altos níveis de *MMP1*. Concluiu-se neste trabalho que esta metaloprotease interage com o seu receptor específico, *PAR1*, e é capaz de promover aumento de invasão e migração das células cancerosas MDA-MB-231 através de estímulos quimioatrativos. Em nosso trabalho, a hipoexpressão de *MMP1* em fibroblastos de linfonodos quando co-cultivados com células epiteliais mamárias, nos leva a refletir sobre a

possibilidade de que após o estabelecimento da micrometástase linfonodal, situação mimetizada em nossas co-culturas, este efeito quimioatrativo não seja mais tão necessário e que, então, esta protease seja modulada negativamente por ação de outras vias de sinalização que possam ter sido reguladas em células estromais, na tentativa de se obter uma resposta contra a propagação das células cancerosas para outros sítios metastáticos.

Outros genes hipoexpressos em fibroblastos de linfonodos co-cultivados com células epiteliais foram: *NUDT5*, *PGCP*, *TMSB4Y*, *LOC84661*, *XTP7*, *C6orf170*, *FLJ11151* e *DKFZP434F091*. O gene *NUDT5* (nudix ,nucleoside diphosphate linked moiety X-type motif 5), localização 10p14-p13, codifica uma hidrolase envolvida no catabolismo de ribonucleosídeos difosfato como ADP-ribose e ADP-manose, que pode ainda prevenir a ocorrência de mutações, pela degradação nucleotídeos guanina oxidados, como 8-oxo-dGTP (Ishibashi *et al.*, 2003); *PGCP* (plasma glutamate carboxypeptidase), localização 8q22.2, codifica uma amino peptidase presente no plasma, cuja seqüência de aminoácidos apresenta homologia com o antígeno de membrana específico de próstata (PSA), expresso em carcinoma da próstata (Gingras *et al.*, 1999); *TMSB4Y* (timosina beta-4), localização Yq11.221, codifica uma proteína envolvida no seqüestro de actina, enquanto a porção 5' não traduzida deste gene pode também codificar um antígeno de histocompatibilidade menor específico do sexo masculino (cromossomo Y), HLA-A*3303 (Torikai *et al.*, 2004); O gene *LOC84661* (dpy-30-like protein), localização 2p22.3, codifica uma proteína nuclear (Strausberg *et al.*, 2002). *DPY-30* é expresso durante a embriogênese de *Caenorhabditis elegans*, envolvido na hipoativação do

cromossomo X, regulação positiva do tamanho corpóreo e locomoção (Hsu *et al.*, 1995); O gene *XTP7*, localização 19q13.32, codifica uma proteína 7 transativada pelo antígeno X do vírus da hepatite B; os genes *C6orf170*, *FLJ111151* e *DKFZP434F091*, codificam proteínas ainda sem função conhecida.

Portanto, entre os genes menos expressos em fibroblastos em co-cultura com células epiteliais encontramos, predominantemente, aqueles envolvidos no controle da transcrição e tradução, sugerindo que estes processos estejam em parte desregulados. Também foram hipoexpressos nesta situação, dois genes que codificam proteases, indicando que fibroblastos presentes em linfonodos, reduzem a síntese de algumas proteases que poderiam estar associadas ao processo de invasão e metástase, como MMP1, e deste modo, apresentem comportamento distinto de fibroblastos presentes no tumor primário. Alguns outros genes cuja expressão foi inibida têm função pouco conhecida.

Em suma, fibroblastos de linfonodos de pacientes com câncer de mama, sejam eles comprometidos ou não, são células com expressão gênica similar. Por outro lado, fatores solúveis de células epiteliais mamárias (MCF10A ou MDA-MB-231) modulam a expressão de 2,2 a 7,8% dos genes destes fibroblastos. As células malignas MDA-MB-231 modularam algumas vias de sinalização em fibroblastos não comprometidos, como vias do cálcio, insulina, hormônio liberador de gonadotrofina (*GnRH*) e da regulação do citoesqueleto de actina. Em fibroblastos de linfonodos comprometidos, algumas funções biológicas foram reguladas exclusivamente por influência da célula maligna, entre as quais podemos destacar metabolismo de aminoácidos, transporte de

ânions, reparo de excisão de base, transporte endossomal, excreção, transporte intra-Golgi, biossíntese de lipídios, secreção de proteínas, biossíntese de nucleotídeo purina e regulação da forma celular. As vias de sinalização e funções biológicas reguladas em fibroblastos pela interação com células epiteliais malignas podem estar implicadas no desenvolvimento de metástases regionais em pacientes com câncer de mama.

6. Conclusões

1. Fibroblastos de linfonodos comprometidos ou não comprometidos provenientes de pacientes com câncer de mama, são células com taxa de proliferação e expressão gênica similar, sendo que os genes PGBD3 e PTBP2 são mais expressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos.

2. Fatores solúveis de células epiteliais mamárias (MCF10A ou MDA-MB-231) modulam a expressão de 2,2 a 7,8% dos genes de fibroblastos de linfonodos.

3. As células malignas MDA-MB-231 modulam algumas vias de sinalização em fibroblastos não comprometidos que podem representar a resposta primária do fibroblasto à presença da célula tumoral.

4. Além disso, as células malignas regulam em fibroblastos de linfonodos comprometidos genes pertencentes a algumas funções biológicas específicas que podem estar implicadas no desenvolvimento de metástases regionais em pacientes com câncer de mama.

7. Anexos

Tabela 4. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos em fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos em co-cultura com células epiteliais normais (MCF10A), em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos isoladamente em cultura. Genes analisados usando-se o programa “Onto-Express”

Function Name	Genes Up regulated	Genes Down regulated	Unique Input Total	Unique Reference Total	Corrected P-Value
alcohol metabolism	<i>ALDH1A3</i>		1	1	0,00000
ATP biosynthesis		<i>ATP5J2</i>	1	1	0,00000
CDP-choline pathway		<i>CHPT1</i>	1	1	0,00000
cellular response to starvation		<i>FADS1</i>	1	1	0,00000
copper ion homeostasis		<i>APP</i>	1	1	0,00000
D-ribose catabolism		<i>NUDT5</i>	1	1	0,00000
Fever	<i>IL1B</i>		1	1	0,00000
Glucose catabolism		<i>GPD2</i>	1	1	0,00000
Glycogen biosynthesis		<i>GYG</i>	1	1	0,00000
histone mRNA 3'-end processing		<i>SLBP</i>	1	1	0,00000
Icosanoid biosynthesis		<i>FADS1</i>	1	1	0,00000
mechanosensory behavior		<i>PMP22</i>	1	1	0,00000
mitotic chromosome condensation	<i>CNAP1</i>		1	1	0,00000
mitotic metaphase/anaphase transition		<i>CDC27</i>	1	1	0,00000
platelet activating factor biosynthesis		<i>CHPT1</i>	1	1	0,00000
pseudouridine synthesis		<i>NOLA3</i>	1	1	0,00000
regulation of neurotransmitter levels		<i>GLUL</i>	1	1	0,00000
ribonucleoside diphosphate catabolism		<i>NUDT5</i>	1	1	0,00000
RNA transport	<i>NUP133</i>		1	1	0,00000
sequestering of actin monomers		<i>TMSB4Y</i>	1	1	0,00000
Response to pathogenic bacteria	<i>NFKBIA</i>	<i>IFNGR1</i>	2	3	0,00138
cytokinesis	<i>ROCK2</i>	<i>DIAPH2, DCTN3</i>	3	7	0,00208
Humoral immune response	<i>EBI3</i>	<i>RFXANK</i>	2	4	0,00485
lipid metabolism	<i>ADIPOR2, ACSL4, ALDH1A3</i>	<i>PTGS1, PHYH, PLCL2, CRYL1, MGST3, ACAT2</i>	9	57	0,00503
DNA replication and chromosome cycle	<i>POLS</i>		1	2	0,01404
oligosaccharide metabolism	<i>GCS1</i>		1	2	0,01438
Telomere maintenance	<i>TNKS2</i>		1	2	0,01474
protein-nucleus export		<i>CALR</i>	1	2	0,01512
sister chromatid cohesion	<i>POLS</i>		1	2	0,01552
glycerol-3-phosphate metabolism		<i>GPD2</i>	1	2	0,01594
glutamine biosynthesis		<i>GLUL</i>	1	2	0,01638
physiological process		<i>PTGS1</i>	1	2	0,01685
chromosome condensation	<i>CNAP1</i>		1	2	0,01735
cysteinyl-tRNA aminoacylation		<i>CARS</i>	1	2	0,01787
keratinocyte differentiation		<i>PTGS1</i>	1	2	0,01843
regulation of embryonic development		<i>LAMA4</i>	1	2	0,01902

Function Name	Genes Up regulated	Genes Down regulated	Unique Input Total	Unique Reference Total	Corrected P-Value
prostaglandin biosynthesis		<i>PTGS1</i>	1	2	0,01966
Aspartyl-tRNA aminoacylation		<i>DARS</i>	1	2	0,02034
nucleotide-excision repair	<i>RAD23A</i>	<i>RAD23B</i>	2	6	0,02071
antigen presentation, endogenous antigen		<i>B2M</i>	1	2	0,02106
energy derivation by oxidation of organic compounds		<i>BCS1L</i>	1	2	0,02184
regulation of transcription, DNA-dependent	<i>PHF17, ZNF198, NAB1</i>	<i>GTF2A2, RFXANK, LAF4, CALR</i>	7	369	0,02791
peptide metabolism		<i>PGCP</i>	1	3	0,02896
regulation of pH	<i>SLC9A8</i>		1	3	0,02946
peripheral nervous system development		<i>PMP22</i>	1	3	0,02998
negative regulation of Wnt receptor signaling pathway	<i>FRZB</i>		1	3	0,03051
cytoplasmic sequestering of NF-kappaB		<i>NFKBIA</i>	1	3	0,03107
Learning and/or memory	<i>ACSL4</i>		1	3	0,03164
N-linked glycosylation	<i>GCS1</i>		2	8	0,03172
transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway	<i>TRIO</i>		1	3	0,03224
regulation of actin polymerization and/or depolymerization		<i>TMSB4Y</i>	1	3	0,03286
regulation of translational initiation		<i>GC20, EIF3S3</i>	2	9	0,03302
fatty acid desaturation		<i>FADS1</i>	1	3	0,03350
oxygen transport	<i>PIP3-E</i>		1	3	0,03417
regulation of transcription		<i>SSBP2, FADS1, PPIE</i>	3	17	0,03478
hormone-mediated signaling	<i>ADIPOR2</i>		1	3	0,03487
regulation of muscle contraction	<i>TPM1</i>		1	3	0,03560
translational initiation		<i>LGTM</i>	1	3	0,03635
double-strand break repair via nonhomologous end-joining		<i>KUB3</i>	1	3	0,03714
cell organization and biogenesis		<i>DIAPH2</i>	1	3	0,03797
Transcription	<i>ZNF198, NAB1</i>	<i>LITAF, GTF2A2, RFXANK, LAF4</i>	6	293	0,04213

Function Name	Genes Up regulated	Genes Down regulated	Unique Input Total	Unique Reference Total	Corrected P-Value
antigen processing, endogenous antigen via MHC class I		<i>B2M</i>	1	4	0,04401
nucleotide metabolism		<i>NUDT5</i>	1	4	0,04461
regulation of cell migration		<i>LAMA4</i>	1	4	0,04522
protein modification	<i>TTL, RAD23A</i>	<i>MANBA, RAD23B</i>	4	28	0,04539
protein targeting	<i>AKAP12</i>		1	4	0,04585
respiratory gaseous exchange		<i>COX5B</i>	1	4	0,04649
regulation of cell differentiation		<i>FADS1</i>	1	4	0,04716
fatty acid oxidation	<i>ADIPOR2</i>		1	4	0,04784
cell communication		<i>FRAS1</i>	1	4	0,04854
regulation of heart contraction rate	<i>TPM1</i>		1	4	0,04927

Tabela 5A. Genes diferencialmente expressos em fibroblastos originários de linfonodos não comprometidos mantidos em co-cultura com células epiteliais MCF10A, em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos isoladamente. Distribuição quanto à ontologia gênica em processos biológicos

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em n-iLNFb + MCF10A / n-iLNFb	Nº Genes	%	Genes Hipoexpressos em n-iLNFb + MCF10A / n-iLNFb	Nº Genes	%
Adesão celular	<i>ITGAV</i>	1	3,12	<i>SSX2IP, EGFR, LAMA4, CIB1, APP</i>	5	5,88
Coagulação		0	0	<i>PROCR</i>	1	1,18
Comportamento	<i>ACSL4</i>	1	3,12	<i>HRAS</i>	1	1,18
Comunicação celular	<i>MYH9, IL1B, CRK, JAK2, AKAP12, NFKBIA, FRZB, ROCK2, TRIO, TGFBRAP1, IL4R, ITGAV</i>	12	37,50	<i>FADS1, EGFR, RIT1, FRAS1, RAB5B, HRAS, PRKRIR, MGST3, FAF1, IFNGR1, DEPDC6, GLUL, SFRP1, PLCL2, PDCD6, APP, GPR35</i>	17	20
Crescimento celular	<i>FGFR2, PHF17</i>	2	6,25	<i>CREG, EBAG9, CHPT1</i>	3	3,53
Desenvolvimento de órgão	<i>TPM1, FRZB</i>	2	6,25	<i>EGFR, HRAS, TPM2</i>	3	3,53
Desenvolvimento de sistema		0	0	<i>GPM6B, PHYH</i>	2	2,35
Desenvolvimento embrionário		0	0	<i>LAMA4</i>	1	1,18
Desenvolvimento tecidual	<i>JAK2</i>	1	3,12	<i>EGFR</i>	1	1,18
Diferenciação celular	<i>FRZB</i>	1	3,12	<i>GPM6B, FADS1, PTGS1, SFRP1, DIAPH2</i>	5	5,88
Homeostase	<i>IL1B, SLC9A8</i>	2	6,25	<i>CALR, APP</i>	2	2,35
Localização	<i>COPE, CRK, JAK2, AKAP12, NFKBIA, ABCC5, SLC9A8, NUP133</i>	8	25	<i>FLJ21977, COX5B, ATP5J2, KIF21B, EGFR, LAMA4, JWA, RIT1, C1QB, RAB5B, NDUFA6, HRAS, FAF1, FXYD3, ATP5L, LGTN, TMSB4Y, CALR, APP, BLVRA, MRPL39, GPD2, TRAPPC1</i>	23	27,06
Locomoção	<i>CRK, JAK2</i>	2	6,25	<i>EGFR, LAMA4, HRAS</i>	3	3,53
Metabolismo	<i>POLS, RAD23A, SPTBN1, FGFR2, PDK4, ACSL4, CRK, JAK2, PHF17, DUSP11, BIRC6, TNKS2, ALDH1A3, EBI3, SIAT6, NAB1, ROCK2, TRIO, TTL</i>	19	59,38	<i>COX5B, MRPS21, ATP5J2, SSBP2, FADS1, PTGS1, CREG, C6orf175, GTF2A2, EGFR, HELSNF1, COPS5, SKP1A, NOLA3, CRYL1, EIF3S3, MRPL9, NDUFA6, UBE2L6, CIB1, RFXANK, PSMA5, SFRS7, PRKRIR, MGST3, MANBA, PHYH, FAF1, MMP1,</i>	58	68,24

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em n-iLNFb + MCF10A / n-iLNFb	Nº Genes	%	Genes Hipoexpressos em n-iLNFb + MCF10A / n-iLNFb	Nº Genes	%
Metabolismo (continuação)				MRPL22, ATP5L, BCS1L, PPIE, SLBP, LGTN, RAD23B, TRIM32, GSTA4, GLUL, GYG, UXT, DSIPI, PLCL2, TMSB4Y, PDCD6, CALR, MRPL24, BLVRA, NUDT5, RPS16, DUSP18, CHPT1, MRPL39, CARS, DARS, GPD2, RNF130, DNAJA3		
Morfogênese	MYH9, FGFR2, PHF17	3	9,38	CREG, HRAS, EBAG9, CHPT1	4	4,71
Morte	IL1B, PHF17, BIRC6, NFKBIA	4	12,50	FLJ21977, FAF1, PDCD6, APP, EBAG9, RNF130, DNAJA3	7	8,24
Percepção sensorial	MYH9	1	3,12	PHYH	1	1,18
Processos fisiológicos celulares	MYH9, POLS, RAD23A, SPTBN1, IL1B, FGFR2, COPE, PDK4, ACSL4, CRK, JAK2, PHF17, DUSP11, BIRC6, TNKS2, ALDH1A3, AKAP12, EBI3, NFKBIA, SIAT6, NAB1, ABCC5, ROCK2, TRIO, SLC9A8, NUP133, TTL	27	84,38	FLJ21977, COX5B, MRPS21, ATP5J2, SSBP2, FADS1, PTGS1, CREG, KIF21B, C6orf175, GTF2A2, EGFR, LAMA4, HELSNF1, JWA, COPS5, SKP1A, NOLA3, RIT1, C1QB, CRYL1, EIF3S3, MRPL9, RAB5B, NDUFA6, UBE2L6, CIB1, RFXANK, PSMA5, HRAS, SFRS7, PRKRIR, TACC1, MANBA, FAF1, MMP1, DCTN3, FXD3, MRPL22, ATP5L, BCS1L, PPIE, SLBP, LGTN, RAD23B, TRIM32, GLUL, GYG, UXT, DSIPI, TMSB4Y, PDCD6, CALR, MRPL24, APP, BLVRA, CDC27, NUDT5, EBAG9, RPS16, DUSP18, CHPT1, MRPL39, CARS, DARS, GPD2, RNF130, TRAPPC1, DNAJA3, DIAPH2	70	82,35
Processos fisiológicos organismal	MYH9, IL1B, TPM1, EBI3, ROCK2, IL4R	6	18,75	COX5B, PTGS1, EGFR, C1QB, B2M, RFXANK, MGST3, PHYH, PROCR, GLUL, APP	11	12,94

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em n-iLNFb + MCF10A / n-iLNFb	Nº Genes	%	Genes Hipoexpressos em n-iLNFb + MCF10A / n-iLNFb	Nº Genes	%
Regulação da atividade enzimática		0	0	<i>PKIA, EGFR</i>	2	2,35
Regulação de processos celulares	<i>SPTBN1, IL1B, CRK, JAK2, PHF17, BIRC6, EBI3, NFKBIA, FRZB, NAB1</i>	10	31,25	<i>SSBP2, FADS1, CREG, C6orf175, GTF2A2, EGFR, LAMA4, HELSNF1, EIF3S3, RFXANK, HRAS, PRKRIR, FAF1, PPIE, DSIPI, TMSB4Y, PDCCD6, CALR, EBAG9, CHPT1, DNAJA3</i>	21	24,71
Regulação de processos fisiológicos	<i>SPTBN1, IL1B, TPM1, CRK, JAK2, PHF17, BIRC6, EBI3, NFKBIA, NAB1</i>	10	31,25	<i>SSBP2, FADS1, CREG, C6orf175, GTF2A2, EGFR, LAMA4, HELSNF1, EIF3S3, RFXANK, HRAS, PRKRIR, FAF1, PPIE, DSIPI, TMSB4Y, PDCCD6, CALR, EBAG9, CHPT1, DNAJA3</i>	21	24,71
Regulação do crescimento	<i>PHF17</i>	1	3,12	<i>CREG, EBAG9, CHPT1</i>	3	3,53
Regulação do desenvolvimento		0	0	<i>FADS1, LAMA4</i>	2	2,35
Regulação negativa de processos biológicos	<i>SPTBN1, IL1B, PHF17, BIRC6, NFKBIA, FRZB, NAB1</i>	7	21,88	<i>PKIA, EGFR, PRKRIR, FAF1, TMSB4Y</i>	5	5,88
Regulação positiva de processos biológicos	<i>EBI3</i>	1	3,12	<i>EGFR, FAF1, PDCCD6</i>	3	3,53
Reprodução sexual		0	0	<i>DIAPH2</i>	1	1,18
Resposta a estímulo biótico	<i>IL1B, EBI3, NFKBIA, IL4R</i>	4	12,50	<i>C1QB, B2M, RFXANK, MGST3, PROCR, IFNGR1</i>	6	7,06
Resposta a estímulos abióticos		0	0	<i>HRAS</i>	1	1,18
Resposta a estímulos endógenos	<i>POLS, RAD23A</i>	2	6,25	<i>C6orf175, CIB1, RAD23B</i>	3	3,53
Resposta a estímulos externos	<i>IL1B, EBI3</i>	2	6,25	<i>FADS1, HRAS, PROCR</i>	3	3,53
Resposta ao stress	<i>POLS, RAD23A, IL1B, PHF17, EBI3, NFKBIA</i>	6	18,75	<i>FADS1, C6orf175, EGFR, C1QB, CIB1, RFXANK, PRKRIR, MGST3, PROCR, RAD23B, IFNGR1, GSTA4</i>	12	14,12

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em n-iLNFb + MCF10A / n-iLNFb	Nº Genes	%	Genes Hipoexpressos em n-iLNFb + MCF10A / n-iLNFb	Nº Genes	%
Resposta celular a estímulos		0	0	FADS1	1	1,18
Genes com GO desconhecido	PM2-ST0303-002-E07, PRO1073, GPR56, RC0-GN0090-032-G05, ZNF198, NMES1, KIAA1194, QV0-GN0140-430-B05, FLJ32028, CNAP1, TM4SF2, HSPC182, PIP3-E, LOC55971, MGC2752, M-RIP, PM0-GN0344-008-D01, GCS1, FLJ20508, C19orf6, FLJ10521, LOC348262, KIAA0143, ADIPOR2, RC4-NT0057-012-C11, INPP5F			FLJ1115, LOC84661, PCTK3, C6orf170, C6orf48, XTP7, HAX1, KUB3, DKFZP434K046, TM4SF3, PGCP, GC20, FLJ23186, LITAF, PEG10, NIFIE14, REA, MtFMT, RNP24, DKFZP564K1964, C21orf59, C7orf36, C14orf123, LAF4, FLJ10803, LOC51035, LEREPO4, MGC14798, FLJ20516, NICE-3, FLJ11016, IPO7, QV0-EN0058-441-G07, C9orf58, PS1D, LOC92906, CGI-119, C20orf111, MRPS28, ACAT2, PMP22, SAT2, SRA1		

Tabela 5B. Genes modulados exclusivamente em fibroblastos de linfonodos comprometidos ou não comprometidos cocultivados com células MCF10A

Classificação Ontológica	Genes Hiperexpressos em n-iLNFB + MCF10A / n-iLNFB	Genes Hipoexpressos em n-iLNFB + MCF10A/ n-iLNFB	Genes Hiperexpressos em iLNFB + MCF10A/ iLNFB	Genes Hipoexpressos em iLNFB + MCF10A / iLNFB
Adesão			CLDN6	
Apoptose	PHF17		HD, TGFB1	CASP14, SULF1, SGK, TP53INP1
Catabolismo		GPD2	MMP2	USP40, MOXD1
Ciclo Celular		DCTN3, HRAS	MACF1, NF1	
Crescimento celular		CREG	ESDN	
proliferação		PRKPIR		SPOCK
Organização cromossômica e biogênese			RIF1	
Atividade ciclase				RCL1
Organização do citoesqueleto			FLNB	
Metabolismo de DNA		RAD23B	MYO18A, PRKDC	SEMA4A
Sinalização de receptores ligados a enzimas	TGFBRAP1			
Sinalização de receptores acoplados à proteína G				EDNRB, PDGFRL
Complexo do fibrinogênio				FGL2
Resposta imune			C3, CCL20, CD97	
Integrante da membrana			IMMTT, TDE2L	GBAS
Ligante de íon				ZDHHC3
metabolismo	SIAT6, ACSL4	MRPL9, BCS1L, DUSP18, TRIM32, UXT, GYG	TIMP1, UBE3B, , SUFU, JIK, MRPS6, MRPL2, NMT1, PRSS15, ANKRD3, TRIM2, ACOX3, H105E3, PTDSS2, B4GALT1, PFKFB4, GMPPA, , ACP2, MYO1C	MMP24, DDOST, ZNF364, SRP72, RPL22, TTLL1, MYLK, CTSC, AASDHPPT, HADHSC, CKMT2
Diferenciação de neurônio			DBN1	
Atividade quinase		PKIA		
Ligante de RNA			SFRS15	
Metabolismo de RNA		SLBP, CARS	PPP1R9B	CUGBP2, RBM3, SF3B4, SFRS3
Percepção sensorial de estímulos mecânicos	MYH9			

Classificação Ontológica	Genes Hiperexpressos em n-iLNFb + MCF10A / n-iLNFb	Genes Hipoexpressos em n-iLNFb + MCF10A/ n-iLNFb	Genes Hiperexpressos em iLNFb + MCF10A/ iLNFb	Genes Hipoexpressos em iLNFb + MCF10A / iLNFb
Contração do músculo liso			SMTN	
Transcrição	CRK, NAB1	SSBP2, FADS1, COPS5, REA	FBXL10, ASXL1, SUPT6H, YY1	UBN1, HOXC9, ZNF297B, NFE2L2, ELF3, VDRIP
Transdução			GMIP	DEPDC4
Fator de tradução			RRN3	
Transporte	AKAP12, NUP133	KIF21B, TRAPPC1, FAF1	CYP26B1, TRPV2, SLC39A14, SEC24A, SLC1A5, COL16A1, VPS13D	ATP5S, CLCA4, NOX4, SCNM1
Sinalização do receptor wnt	FRZB	SFRP1	APC	
Genes com GO desconhecido	CNAP1, FLJ10521, KIAA0143, LOC348262, LOC55971, PM0-GN0344-008-D01, RC4-NT0057-012-C11, TM4SF2, ,	C20orf111, C7orf36, C9orf58, CGI-119, DKFZP564K1964, FLJ10803, FLJ11016, LEREPO4, LOC51035, LOC92906, NICE-3, NIFIE14, QV0-EN0058-441-G07,,	C20orf22, C20orf110, CM0-AN0004-497-F07, D2S448, FLJ13, 213, GDI1, LRRC8, MBC2, MGC3047, MR3-GN0186-009-H05, MST4, RAI, RBAF600, ERMAP, LRP4, MCM2, MLZE, RC3	BC-2, C13orf24, C1orf24, C6orf168, C9orf19, C9orf74, CM0-HT1295-779-D06, CYFIP2, FLJ11588, FLJ13840, HSPC121, IFRG15, KIAA0644, KIAA1102, LR8, MGC2747, MGC45714, NSE1, PRSS11, RC0-BN0280-025-H02, RC3-CI0043-024-D07, SELS, AUTS2, Lrp2bp, MIR, PRDX6, RUND1, SPG20

Tabela 6. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos em fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos em co-cultura com células epiteliais malignas (MDA-MB-231), em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos isoladamente em cultura. Genes analisados usando-se o programa “Onto-Express”

Function Name	Genes Up regulated	Genes Down regulated	Unique Input Total	Unique Reference Total	Corrected P-Value
Induction of apoptosis by extracellular signals		<i>DAPK1, PDCD6</i>	2	7	0,00860
Glutamine biosynthesis		<i>GLUL</i>	1	2	0,00893
cytokinesis	<i>ROCK2</i>	<i>DIAPH2</i>	2	7	0,00898
transcription, DNA-dependent	<i>POLR2A</i>		1	2	0,00939
Activation of NF-kappaB transcription factor		<i>PRDX3</i>	1	2	0,00988
L-glutamate transport		<i>SLC1A3</i>	1	2	0,01043
aspartyl-tRNA aminoacylation		<i>DARS</i>	1	2	0,01104
peptide metabolism		<i>PGCP</i>	1	3	0,01487
regulation of pH	<i>SLC9A8</i>		1	3	0,01528
transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway	<i>TRIO</i>		1	3	0,01618
regulation of actin polymerization and/or depolymerization		<i>TMSB4Y</i>	1	3	0,01667
dicarboxylic acid transport		<i>SLC1A3</i>	1	3	0,01719
rRNA processing	<i>EXOSC2</i>	<i>NOLA3</i>	2	10	0,01723
oxygen transport	<i>PIP3-E</i>		1	3	0,01774
superoxide metabolism		<i>NCF2</i>	1	3	0,01833
regulation of translational initiation		<i>EIF3S3, GC20</i>	2	9	0,01881
regulation of muscle contraction	<i>TPM1</i>		1	3	0,01897
translational initiation		<i>LGTN</i>	1	3	0,01964
double-strand break repair via nonhomologous end-joining		<i>KUB3</i>	1	3	0,02037
heme biosynthesis		<i>UROS</i>	1	4	0,02107
cell organization and biogenesis		<i>DIAPH2</i>	1	3	0,02115
nucleotide metabolism		<i>NUDT5</i>	1	4	0,02149
cellular defense response	<i>EBI3</i>	<i>NCF2</i>	2	11	0,02192
respiratory gaseous exchange		<i>COX5B</i>	1	4	0,02193
leukotriene biosynthesis		<i>MGST2</i>	1	4	0,02239
ER to Golgi transport	<i>BET1</i>	<i>SEC31L1</i>	2	11	0,02249
phosphoinositide-mediated signaling		<i>ERBB2</i>	1	4	0,02286
protein biosynthesis		<i>MRPL24, DARS, EIF3S3, MRPL22, RPL18, MRPS21,</i>	6	63	0,02331
cell communication		<i>FRAS1</i>	1	4	0,02336
regulation of heart contraction rate	<i>TPM1</i>		1	4	0,02388
protein-mitochondrial targeting		<i>TIMM17A</i>	1	4	0,02442
cell death		<i>APP</i>	1	4	0,02499
nitrogen compound metabolism		<i>GLUL</i>	1	4	0,02558
Ceramide metabolism		<i>ASAHI</i>	1	5	0,03240

Function Name	Genes Up regulated	Genes Down regulated	Unique Input Total	Unique Reference Total	Corrected P-Value
response to DNA damage stimulus		<i>CIB1</i>	1	5	0,03301
phospholipid metabolism	<i>PLA2G5</i>		1	5	0,03364
response to pest, pathogen or parasite		<i>CAPG</i>	1	6	0,04273
heart development		<i>ERBB2</i>	1	6	0,04345
double-strand break repair		<i>CIB1</i>	1	6	0,04420
protein-nucleus import	<i>RANBP2</i>		1	6	0,04497
metal ion transport	<i>SLC39A7</i>		1	6	0,04578
positive regulation of transcription	<i>SUPT4H1</i>		1	6	0,04661

Figura 16. Via de sinalização do cálcio modulada em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivados com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB-231). Genes hiperexpressos marcados em vermelho e genes hipoexpressos marcados em azul.

Figura 17. Via de sinalização da insulina modulada em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivados com células epiteliais mamárias malignas(MDA-MB-231). Genes hiperexpressos marcados em vermelho e genes hipoexpressos marcados em azul.

Figura 18. Via de sinalização do hormônio liberador de gonadotrofina modulada em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivados com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB-231). Genes hiperexpressos marcados em vermelho e genes hipoexpressos marcados em azul.

Figura 19. Via da regulação do citoesqueleto de actina modulada em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivados com células epiteliais mamárias malignas (MDA-MB-231). Genes hiperexpressos marcados em vermelho e genes hipoexpressos marcados em azul.

Tabela 7A. Genes diferencialmente expressos em fibroblastos originários de linfonodos não comprometidos mantidos em co-cultura com células epiteliais MDA-MB-231, em relação a fibroblastos de linfonodos não comprometidos mantidos isoladamente. Distribuição quanto à ontologia gênica em processos biológicos

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em n-iLNFb + MDA-MB-231 / n-iLNFb	Nº Genes	%	Genes Hipoeexpressos em n-iLNFb + MDA-MB-231 / n-iLNFb	Nº Genes	%
Adesão celular	<i>ENTPD1</i>	1	3,45	<i>APP, CIB1, POSTN</i>	3	5
Coagulação	<i>ENTPD1</i>	1	3,45		0	0
Comportamento		0	0	<i>RALA</i>	1	1,67
Comunicação celular	<i>ANGPT2, MAP3K4, DIRAS1, HMOX1, ENTPD1, TULP3, ROCK2, ADAMTS1, TRIO, JAK2, IL4R</i>	11	37,93	<i>DAPK1, SLC1A3, RGS2, GLUL, ERBB2, RIT1, PDCD6, FRAS1, APP, GPR35, MGST2, RALA</i>	12	20
Crescimento celular	<i>FGFR2</i>	1	3,45	<i>CHPT1</i>	1	1,67
Desenvolvimento de órgão	<i>ANGPT2, TPM1</i>	2	6,90	<i>ERBB2, POSTN</i>	2	3,33
Desenvolvimento e sistema		0	0	<i>GPM6B, ERBB2, PHYH</i>	3	5
Desenvolvimento tecidual	<i>JAK2</i>	1	3,45		0	0
Diferenciação celular	<i>ANGPT2</i>	1	3,45	<i>GPM6B, DIAPH2</i>	2	3,33
Homeostase	<i>SLC9A8</i>	1	3,45	<i>APP</i>	1	1,67
Localização	<i>BET1, CLTC, RANBP2, SLC9A8, JAK2, SLC39A7</i>	6	20,69	<i>FLJ21977, COX5B, SLC1A3, LGTN, TIMM17A, SSR4, TMSB4Y, RIT1, ATP5H, APP, BLVRA, NDUFA6, MRPL39, SEC31L1</i>	14	23,33
Locomoção	<i>JAK2</i>	1	3,45		0	0
Metabolismo	<i>MAP3K4, EBI3, SUPT4H1, PHF3, PGBD3, HMOX1, FGFR2, USP7, RANBP2, TULP3, MASTL, ROCK2, ADAMTS1, TRIO, JAK2, EXOSC2, POLR2A, PLA2G5, DUSP11, BIRC6</i>	20	68,97	<i>MRPL22, RPL18, DAPK1, COX5B, PPIE, MRPS21, LGTN, PSMB9, CDC14A, GSTA4, PYGL, GLUL, ASAH1, GTF2A2, DSIPI, UROS, HELSNF1, SKP1A, PMPCB, POLR3E, TMSB4Y, NOLA3, ERBB2, PDCD6, EIF3S3, MRPL24, ATP5H, BLVRA, NDUFA6, MGST2, UBE2L6, CIB1, RFXANK, NUDT5, PSMA5, CHPT1, MRPL39, SMARCE1, PHYH, DARS, CAPG, PRDX3, NCF2, POLR2E, MMP1</i>	45	75

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em n-iLNFb + MDA-MB-231 / n-iLNFb	Nº Genes	%	Genes Hipoeexpressos em n-iLNFb + MDA-MB-231 / n-iLNFb	Nº Genes	%
Morfogênese	ANGPT2, FGFR2	2	6,90	ERBB2, CHPT1	2	3,33
Morte	BIRC6	1	3,45	FLJ21977, DAPK1, PDCD6, APP, NGFRAP1	5	8,33
Percepção sensorial	PGBD3	1	3,45	PHYH	1	1,67
Processos fisiológicos celulares	MAP3K4, EBI3, BET1, CLTC, SUPT4H1, PHF3, PGBD3, HMOX1, FGFR2, USP7, RANBP2, TULP3, MASTL, ROCK2, ADAMTS1, TRIO, SLC9A8, JAK2, EXOSC2, POLR2A, PLA2G5, DUSP11, BIRC6, SLC39A7	24	82,76	MRPL22, FLJ21977, RPL18, DAPK1, COX5B, SLC1A3, PPIE, MRPS21, LGTN, RGS2, PSMB9, TIMM17A, SSR4, CDC14A, PYGL, GLUL, ASAH1, GTF2A2, DSIPI, UROS, HELSNF1, SKP1A, PMPCB, POLR3E, TMSB4Y, NOLA3, ERBB2, RIT1, PDCD6, EIF3S3, MRPL24, ATP5H, APP, BLVRA, NDUFA6, MGST2, UBE2L6, CIB1, RFXANK, NUDT5, PSMA5, CHPT1, MRPL39, SMARCE1, DARS, NGFRAP1, CAPG, PRDX3, NCF2, SEC31L1, POLR2E, MMP1, DIAPH2, COX5B, SLC1A3, PSMB9, GLUL, APP, MGST2, RFXANK, PHYH, NCF2	53	88,33
Processos fisiológicos organismal	EBI3 PGBD3 ENTPD1 ROCK2 TPM1 IL4R	6	20,69	PSMB9 GLUL APP MGST2 RFXANK PHYH NCF2	9	15
Regulação da atividade enzimática	MAP3K4	1	3,45		0	0
Regulação de processos celulares	EBI3 SUPT4H1 PHF3 PGBD3 HMOX1 TULP3 ADAMTS1 JAK2 POLR2A BIRC6	10	34,48	DAPK1 PPIE RGS2 CDC14A GTF2A2 DSIPI HELSNF1 TMSB4Y PDCD6 EIF3S3 RFXANK CHPT1 SMARCE1 CAPG PRDX3	15	25
Regulação de processos fisiológicos	EBI3 SUPT4H1 PHF3 PGBD3 TULP3 TPM1 ADAMTS1 JAK2 POLR2A BIRC6	10	34,48	DAPK1 PPIE CDC14A GTF2A2 DSIPI HELSNF1 TMSB4Y PDCD6 EIF3S3 RFXANK CHPT1 SMARCE1 CAPG PRDX3	14	23,33
Regulação do crescimento		0	0	CHPT1	1	1,67

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em n-iLNFb + MDA-MB-231 / n-iLNFb	Nº Genes	%	Genes Hipoeexpressos em n-iLNFb + MDA-MB-231 / n-iLNFb	Nº Genes	%
Regulação negativa de processos biológicos	<i>ADAMTS1 BIRC6</i>	2	6,90	<i>RGS2 TMSB4Y SMARCE1 CAPG</i>	4	6,67
Regulação positiva de processos biológicos	<i>MAP3K4 EBI3 SUPT4H1 HMOX1</i>	4	13,79	<i>DAPK1 PDCD6</i>	2	3,33
Reprodução sexual		0	0	<i>DIAPH2</i>	1	1,67
Resposta a estímulos abióticos		0	0	<i>RALA</i>	1	1,67
Resposta a estímulos bióticos	<i>EBI3 ENTPD1 IL4R</i>	3	10,34	<i>PSMB9 MGST2 RFXANK CAPG NCF2</i>	5	8,33
Resposta a estímulos endógenos	<i>PGBD3</i>	1	3,45	<i>CIB1</i>	1	1,67
Resposta a estímulos externos	<i>EBI3 ENTPD1</i>	2	6,90	<i>NCF2 RALA</i>	2	3,33
Resposta ao estresse	<i>MAP3K4 EBI3 PGBD3 ENTPD1</i>	4	13,79	<i>GSTA4 MGST2 CIB1 RFXANK CAPG NCF2</i>	6	10
Genes com GO desconhecido	<i>PM2-ST0303-002-E07, PRO1073, FLJ32028, SIAT1, RC0-GN0090-032-G05, PIP3-E, LOC162427, C19orf6, MGC12972, MGC15875, KIAA1194, GALNAC4S-6ST, KIAA1450, QV0-GN0140-430-B05, PLEKHA1, MGC33488, FLJ20508, SH3GLB1, POLQ,</i>			<i>LOC84661, XTP7, PCTK3, FLJ11151, C6orf170, C6orf48, MGC5306, C7orf35, KUB3, LOC51693, MGC20460, HYPK, SPUF, HAX1, PGCP, RC0-FN0025-021-E06, FLJ20516, LITAF, FLJ21156, PS1D, Ufc1, LOC133619, GC20, C14orf123, DKFZP434K046, LAF4, MDS025, CALM3, CALM2, SAT2, TRB2,</i>		

Tabela 7B. Genes modulados exclusivamente em fibroblastos de linfonodos comprometidos ou não comprometidos cocultivados com células MDA-MB-231

Classificação Ontológica	Genes Hiperexpressos em n-iLNFb + MDA-MB-231 / n-iLNFb	Genes Hipoexpressos em n-iLNFb + MDA-MB-231 / n-iLNFb	Genes Hiperexpressos em iLNFb + MDA-MB-231 / iLNFb	Genes Hipoexpressos em iLNFb + MDA-MB-231 / iLNFb
Adesão			ASAM, GJA1	
Metabolismo de aminoácidos			GCAT	
Angiogênese	ANGPT2			
Apoptose		DAPK1	AXUD1, FAIM2	
Ligante de ATP				DNCLI2
Fator de ligação			SLB	
Coagulação			FBLN5	
Homeostase do cátion			ABCB6	
Metabolismo de carboidratos		PYGL		
Metabolismo de lipídeos			SPHK1, ACLY	ACSL3
Metabolismo de proteínas			FLJ32332, ALG8	TRA1, PTPRC, LOD2
Organização do citoesqueleto		CAPG	ACTN4, TBCD	
Reparo de DNA	POLQ			OGG1
Desenvolvimento ectodérmico				KRT5
Atividade inibidora de enzima		CSTA	ECG2	
Sinalização de receptores ligados a enzimas			PIK3R3	
Constituinte estrutural da matriz extracelular		FBLN2	EMILIN2	
Sinalização de receptores acoplados à proteína G		CALM3		
Ligante de fator de crescimento			LTBP3	
Metabolismo do heme	HMOX1	UROS		
Resposta imune	GALNAC4S-6ST, ENTPD1	NCF2		
Atividade quinase				ITPKC
Integrante da membrana			CLPTM1, JPHL1	FLJ20160
Ligante de lipídios	PLEKHA1			
Atividade liase			KIDINS220	

Classificação Ontológica	Genes Hiperexpressos em n-iLNFb + MDA-MB-231 / n-iLNFb	Genes Hipoexpressos em n-iLNFb + MDA-MB-231 / n-iLNFb	Genes Hiperexpressos em iLNFb + MDA-MB-231 / iLNFb	Genes Hipoexpressos em iLNFb + MDA-MB-231 / iLNFb
Biossíntese de macromoléculas	<i>SIAT1</i>	<i>RPL18</i>		
Ligante de ácidos nucleicos			<i>RPP25</i>	
Atividade oxidoreductase		<i>PRDX3</i>		
Metabolismo do fosfato	<i>MAP3K4, MASTL</i>	<i>CDC14A, ERBB2</i>		
Ligante de proteínas	<i>ARHGEF12</i>		<i>TMEM8, INADL DGCR2</i>	
Catabolismo de proteínas	<i>ADAMTS1, USP7</i>	<i>PSMB, 9MPPB</i>		
Regulação da proliferação celular			<i>NEK9</i>	<i>NS</i>
Resposta a estímulos				<i>MIG-6</i>
Resposta ao estresse oxidativo				<i>TXNIP</i>
Metabolismo de RNA	<i>EXOSC2</i>			<i>HNRPH3</i>
Percepção sensorial				<i>PDE6D</i>
Transdução de sinal mediada por GTPase	<i>DIRAS1</i>			
Transcrição	<i>TULP3, SUPT4H1, PHF3</i>	<i>POLR2E</i>	<i>ELK1, MSC, CXXC1, CHES1</i>	<i>RBPSUH, TIEG2</i>
Atividade de transporte	<i>CLTC, BET</i>	<i>SLC1A3, TIMM17A</i>	<i>ARFGAP1, TOM1, TOM1L2, VPS24, C6orf85, AKT1S1, SPINL, SEC61A1, PITPNC1</i>	<i>SNAPAP, SLC9A7, CLCN5</i>
Genes com GO desconhecido	<i>KIAA1450, GC12972, MGC33488, PGBD3</i>	<i>LOC133619</i>	<i>QV3-HT1017-481-E02</i>	<i>ACN9, FAM8A1, VMP1</i>

Tabela 8. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos em co-cultura com células epiteliais normais (MCF10A), em relação a fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos isoladamente em cultura. Genes analisados usando-se o programa “Onto-Express”

Function Name	Genes Up regulated	Genes Down regulated	Unique Input Total	Unique Reference Total	Corrected P-Value
alcohol metabolism	<i>ALDH1A3</i>		1	1	0,00000
AMP biosynthesis	<i>ADSS</i>		1	1	0,00000
antigen presentation, endogenous peptide antigen	<i>TRPC4AP</i>		1	1	0,00000
ATP biosynthesis		<i>ATP5J2</i>	1	1	0,00000
ATP-dependent proteolysis	<i>PRSS15</i>		1	1	0,00000
autophagy	<i>MAP1LC3B</i>	<i>APG12L</i>	2	2	0,00000
carboxylic acid metabolism		<i>ASAH1</i>	1	1	0,00000
cytoskeletal anchoring	<i>FLNB</i>		1	1	0,00000
cytosol to ER transport	<i>TRPC4AP</i>		1	1	0,00000
detection of sound	<i>MYO1C</i>		1	1	0,00000
D-ribose catabolism		<i>NUDT5</i>	1	1	0,00000
erythrocyte maturation	<i>TIMP1</i>		1	1	0,00000
fat body development	<i>DGAT1</i>		1	1	0,00000
fever	<i>IL1B</i>		1	1	0,00000
G-protein signaling, coupled to IP3 second messenger (phospholipase C activating)		<i>EDNRB</i>	1	1	0,00000
heparan sulfate proteoglycan metabolism		<i>SULF1</i>	1	1	0,00000
histone phosphorylation	<i>MAP3K12</i>		1	1	0,00000
I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade		<i>HSPC121</i>	1	1	0,00000
mechanosensory behavior		<i>PMP22</i>	1	1	0,00000
mitotic metaphase/anaphase transition		<i>CDC27</i>	1	1	0,00000
negative regulation of membrane protein ectodomain proteolysis	<i>TIMP1</i>		1	1	0,00000
neuromuscular junction development	<i>NRD1</i>	<i>CUGBP2</i>	2	2	0,00000
N-linked glycosylation via asparagine		<i>DDOST</i>	1	1	0,00000
N-terminal protein lipidation	<i>NMT1</i>		1	1	0,00000
peptide transport	<i>TRPC4AP</i>		1	1	0,00000
peptidoglycan biosynthesis		<i>GLCE</i>	1	1	0,00000
peptidyl-serine phosphorylation	<i>MAP3K12</i>		1	1	0,00000
peptidyl-threonine phosphorylation	<i>MAP3K12</i>		1	1	0,00000
phospholipid scrambling		<i>PLSCR4</i>	1	1	0,00000
positive regulation of mitosis	<i>SHC1</i>		1	1	0,00000
positive regulation of protein kinase activity	<i>MAP2K3</i>		1	1	0,00000
prostaglandin biosynthesis	<i>PTGIS</i>	<i>PTGS1</i>	2	2	0,00000
protein polyubiquitination		<i>UBE2V2</i>	1	1	0,00000
pseudouridine synthesis		<i>NOLA3</i>	1	1	0,00000

Function Name	Genes Up regulated	Genes Down regulated	Unique Input Total	Unique Reference Total	Corrected P-Value
regulation of cell growth by extracellular stimulus	<i>PPP1R9B</i>		1	1	0,00000
regulation of dendrite morphogenesis	<i>DBN1</i>		1	1	0,00000
regulation of neuronal synaptic plasticity	<i>DBN1</i>		1	1	0,00000
response to glucose stimulus		<i>SELS</i>	1	1	0,00000
ribonucleoside diphosphate catabolism		<i>NUDT5</i>	1	1	0,00000
RNA methylation		<i>METTL3</i>	1	1	0,00000
sequestering of actin monomers	<i>TMSB4Y</i>		1	1	0,00000
triacylglycerol metabolism	<i>DGAT1</i>		1	1	0,00000
response to pathogenic bacteria	<i>NFKBIA</i>	<i>IFNGR1</i>	2	3	0,00509
antigen processing, endogenous antigen via MHC class I	<i>TRPC4AP</i>	<i>B2M</i>	2	4	0,01824
smooth muscle contraction	<i>SMTN</i>	<i>KIAA1102</i>	2	4	0,01866
lipid metabolism	<i>HADHA, ACOX3, ADIPOR2, CRYL1, PTGIS, ALDH1A3, LCAT</i>	<i>HADHSC, PHYH, CRYL1, MGST3, PTGS1</i>	11	57	0,01919
antimicrobial humoral response (sensu Vertebrata)	<i>YY1, IL1B, CCL20</i>	<i>MGST3, MGST2</i>	5	18	0,02115
heparin biosynthesis		<i>GLCE</i>	1	2	0,03287
fatty acid biosynthesis	<i>FADS2 PTGIS</i>	<i>AASDHPPT, PTGS1</i>	4	14	0,03315
establishment of protein localization		<i>SELS</i>	1	2	0,03329
regulation of cell redox homeostasis		<i>SELS</i>	1	2	0,03372
proton transport	<i>ATP5L, ATP5H, ATP5J2, ATP5S</i>		4	14	0,03385
phosphatidylserine biosynthesis	<i>PTDSS2</i>		1	2	0,03416
carbohydrate transport	<i>SLC35A4</i>		1	2	0,03462
regulation of epidermal growth factor receptor activity	<i>SHC1</i>		1	2	0,03509
bile acid metabolism	<i>ACOX3</i>		1	2	0,03557
antigen presentation, endogenous antigen		<i>B2M</i>	1	2	0,03606
heparan sulfate proteoglycan biosynthesis		<i>GLCE</i>	1	2	0,03657
Telomere maintenance	<i>TNKS2</i>		1	2	0,03709
fatty acid metabolism	<i>HADHA, ACOX3</i>	<i>HADHSC, CRYL1, ASA1</i>	5	22	0,03734
catecholamine metabolism		<i>MOXD1</i>	1	2	0,03763
physiological process		<i>PTGS1</i>	1	2	0,03818
protein-nucleus export		<i>CALR</i>	1	2	0,03875
regulation of DNA repair		<i>UBE2V2</i>	1	2	0,03934
sister chromatid cohesion	<i>POLS</i>		1	2	0,03994
complement activation, alternative C3 pathway			1	2	0,04057
vesicle targeting	<i>YKT6</i>		1	2	0,04121
protein-lipoylation	<i>NMT1</i>		1	2	0,04188

Function Name	Genes Up regulated	Genes Down regulated	Unique Input Total	Unique Reference Total	Corrected P-Value
N-terminal protein myristoylation	<i>NMT1</i>		1	2	0,04256
regulation of embryonic development		<i>LAMA4</i>	1	2	0,04327
retrograde transport, Golgi to ER	<i>COPE, GBF1</i>		2	6	0,04345
activation of MAPK	<i>SHC1, ADORA2B</i>		2	6	0,04398
phospholipid catabolism		<i>PRDX6</i>	1	2	0,04401
metal ion transport	<i>SLC39A14, SLC39A7</i>		2	6	0,04452
beta-tubulin folding	<i>TBCE</i>		1	2	0,04477
transcription, DNA-dependent	<i>POLR2A</i>		1	2	0,04555
unfolded protein response		<i>SELS</i>	1	2	0,04636
retrograde protein transport, ER to cytosol		<i>SELS</i>	1	2	0,04721
DNA replication and chromosome cycle	<i>POLS</i>		1	2	0,04808
keratinocyte differentiation		<i>PTGS1</i>	1	2	0,04899
redox signal response		<i>SELS</i>	1	2	0,04993

Tabela 9. Genes diferencialmente expressos em fibroblastos originários de linfonodos comprometidos mantidos em co-cultura com células epiteliais MCF10A, em relação a fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos isoladamente. Distribuição quanto à ontologia gênica em processos biológicos

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em iLNFb + MCF10A / iLNFb	Nº Genes	%	Genes Hipoexpressos em iLNFb + MCF10A / iLNFb	Nº Genes	%
Adesão celular	<i>ITGB1, ESDN, APC, COL16A1, ITGAV, CD97, CLDN6</i>	7	6,73	<i>SSX2IP, EGFR, LAMA4, SPOCK</i>	4	3,70
Coagulação		0	0	<i>PROCR, PLSCR4</i>	2	1,85
Comportamento	<i>HD, CCL20</i>	2	1,92	<i>CKLFSF4</i>	1	0,93
Comunicação celular	<i>ITGB1, ESDN, INPPL1, TGFB1, GMIP, NFKBIA, APC, JIK, CCL20, NF1, C3, FLNB, TRIO, DBN1, ITGAV, IL1B, MAP2K3, MAP3K12, SHC1, PPP1R9B, SUFU, CD97, RANGAP1, SUPT6H, LIMK1</i>	25	24,04	<i>EGFR, RAB5B, MGST2, MGST3, GIT1, SEL1L, ARHE, GPR35, VDRIP, SNX5, SRP72, RGS2, IFNGR1, GNG11, ADORA2B, DEPDC4, EDNRB</i>	17	15,74
Crescimento celular	<i>ESDN, TGFB1, SHC1, PPP1R9B</i>	4	3,85	<i>EBAG9</i>	1	0,93
Desenvolvimento de órgão	<i>HD, FLNB, NRD1, SUFU, TIMP1, SMTN</i>	6	5,77	<i>EGFR, CUGBP2, TPM2</i>	3	2,78
Desenvolvimento de sistema	<i>DBN1, LIMK1</i>	2	1,92	<i>PHYH, SPOCK, SEMA4A, EDNRB</i>	4	3,70
Desenvolvimento embrionário		0	0	<i>LAMA4</i>	1	0,93
Desenvolvimento tecidual		0	0	<i>EGFR, ELF3, CASP14, EVPL</i>	4	3,70
Diferenciação celular	<i>FLNB, DBN1, TIMP1</i>	3	2,88	<i>PTGS1, SEMA4A</i>	2	1,85
Homeostase	<i>IL1B</i>	1	0,96	<i>CALR</i>	1	0,93
Interação fisiológica entre organismos	<i>COL16A1, TEAD3</i>	2	1,92		0	0
Interações inter-espécies entre organismos	<i>HD</i>	1	0,96		0	0
Localização	<i>ACOX3, CYP26B1, SLC39A14, COPE, RANBP2, SLC4A2, NFKBIA, PTGIS, COL16A1, SEC24A, SLC1A5, NRD1, SCAMP3, TRPV2, TRPC4AP, SLC36A1, DHCR24, CD97, GBF1, VPS13D, SLC35A4, LIMK1, NDUFB2, SLC39A7</i>	24	23,08	<i>EGFR, RAB5B, NOX4, SGK, SEC31L1, ATP5S, KCTD15, SSR4, ARHE, TMSB4Y, ATP5J2, LAMA4, JWA, SNX5, C1QB, SPOCK, CLCA4, AQP3, ATP5L, FUBP1, LGTN, SEC61A2, SLC7A2, CALR, ATP5H</i>	25	23,15
Locomoção	<i>NRD1, CD97, LIMK1</i>	3	2,88	<i>EGFR, LAMA4, SPOCK</i>	3	2,78
Metabolismo	<i>MMP2, ACOX3,</i>	67	64,4	<i>MRPS21, C6orf175,</i>	73	67,59

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em iLNFb + MCF10A / iLNFb	Nº Genes	%	Genes Hipoexpressos em iLNFb + MCF10A / iLNFb	Nº Genes	%
	ZMPSTE24, TBCE, RAD23A, HADHA, SPTBN1, INPPL1, MYO18A, CYP26B1, MBD3, EIF2B5, RANBP2, CPZ, PDK4, GMPPA, POLR2A, BIRC6, NMT1, ALDH1A3, DNAJB1, RNF40, LMO7, APC, JIK, PTGIS, TRIM2, FBXL10, ADSS, PRPF8, ASXL1, H105E3, TRIO, PLA2G5, MRPS6, YY1, TTL, FADS2, POLS, MAP2K3, PTDSS2, UBE3B, LCAT, NRD1, MAP3K12, MAP1LC3B, TEAD3, NCOR2, TNKS2, PRKDC, TRPC4AP, FBXW5, PPP1R9B, SUFU, DHCR24, MRPL2, ANKRD3, TIMP1, SUPT6H, B4GALT1, LIMK1, PFKFB4, NRF, NDUFB2, TESK1, PRSS15, PTP4A1		2	EGFR, SDCCAG10, SKP1A, NOLA3, CRYL1, MGST2, CKMT2, MGST3, NOX4, CUGBP2, MANBA, PHYH, SGK, SFRS3, CTSC, ZNF364, ZNF335, TMSB4Y, NUDT5, NFE2L2, ELF3, TTLL1, RNF130, VDRIP, DNAJA3, ZNF297B, ATP5J2, PTGS1, ASAH1, GTF2A2, HELSNF1, POLR3E, MYLK, METTL3, EIF3S3, CASP14, UBE2L6, SRP72, UBE2V2, HADHSC, SFRS7, USP40, SF3B4, MOXD1, MMP1, ATP5L, SEMA4A, FUBP1, LGTN, TAF12, DSIPI, PSMC6, SLC7A2, MMP24, CALR, LSM3, ATP5H, DDOST, CBR1, AASDHPPT, UBN1, HOXC9, RPL15, RPS16, RPL22, ZNF189, SULF1, HNRPA2B1, RBM3, EMX2, SMARCE1		
Morfogênese	ESDN, TGFB1, HD, DBN1, SHC1, PPP1R9B, TIMP1	7	6,73	EBAG9, ELF3	2	1,85
Morte	MYO18A, TGFB1, HD, BIRC6, NFKBIA, IL1B	6	5,77	SGK, EBAG9, RNF130, DNAJA3, CASP14, NGFRAP1, TP53INP1, SULF1	8	7,41
Percepção sensorial	CCL20, PRPF8, TRPV2, DIAPH1	4	3,85	PHYH, CKLFSF4, EDNRB	3	2,78
Processos fisiológicos celulares	MMP2, ACOX3, MACF1, ZMPSTE24, TBCE, RAD23A, HADHA, SPTBN1, ESDN, INPPL1, MYO18A, CYP26B1, MBD3, SLC39A14, COPE, EIF2B5, RANBP2, TGFB1, CPZ, PDK4, HD, POLR2A, BIRC6, SLC4A2, NMT1, ALDH1A3, DNAJB1,	93	89,42	MRPS21, C6orf175, EGFR, SDCCAG10, SKP1A, NOLA3, CRYL1, RAB5B, MGST2, CKMT2, NOX4, CUGBP2, MANBA, SGK, SEC31L1, SFRS3, CTSC, ATP5S, ZNF364, KCTD15, SSR4, ARHE, ZNF335, TMSB4Y, CDC27, NUDT5,	89	82,41

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em iLNFb + MCF10A / iLNFb	Nº Genes	%	Genes Hipoexpressos em iLNFb + MCF10A / iLNFb	Nº Genes	%
Processos fisiológicos celulares (continuação)	<i>RNF40, NFKBIA, LMO7, APC, JIK, PTGIS, TRIM2, NF1, FBXL10, COL16A1, FLNB, ADSS, PRPF8, ASXL1, H105E3, TRIO, CCND2, DBN1, PLA2G5, MRPS6, YY1, TTL, SEC24A, SLC1A5, GAS2L1, FADS2, POLS, IL1B, MAP2K3, PTDSS2, UBE3B, LCAT, NRD1, SCAMP3, TRPV2, MAP3K12, MAP1LC3B, Rif1, TEAD3, NCOR2, TNKS2, PRKDC, SHC1, TRPC4AP, SLC36A1, FBXW5, PPP1R9B, SUFU, DHCR24, CD97, MRPL2, GBF1, ANKRD3, SLC35A4, TIMP1, SUPT6H, B4GALT1, LIMK1, PFKFB4, NRF, NDUFB2, SLC39A7, TESK1, PRSS15, PTP4A1, DIAPH1</i>			<i>EBAG9, NFE2L2, ELF3, TTLL1, RNF130, VDRIP, DNAJA3, ZNF297B, ATP5J2, PTGS1, ASAH1, GTF2A2, LAMA4, HELSNF1, JWA, SNX5, POLR3E, MYLK, METTL3, C1QB, EIF3S3, CASP14, SPOCK, UBE2L6, SRP72, UBE2V2, HADHSC, SFRS7, USP40, NGFRAP1, CLCA4, SF3B4, AQP3, MOXD1, TP53INP1, MMP1, ATP5L, SEMA4A, FUBP1, LGTN, RGS2, TAF12, DSIPI, SEC61A2, SLC7A2, MMP24, CALR, LSM3, PLSCR4, ATP5H, DDOST, AASDHPPT, UBN1, HOXC9, RPL15, RPS16, RPL22, ZNF189, SULF1, HNRPA2B1, RBM3, EMX2, SMARCE1, EGFR, MGST2, B2M, CKMT2, MGST3, CUGBP2, PHYH, CTSC, CKLFSF4, PPP1R12A, PTGS1, C1QB, AQP3, PROCR, ADORA2B, PLSCR4, EDNRB</i>		
Processos fisiológicos organismal	<i>ITGB1, CCL20, C3, COL16A1, PRPF8, DBN1, YY1, IL1B, TRPV2, TEAD3, TRPC4AP, CD97, SMTN, DIAPH1</i>	14	13,46		17	15,74
Processos fisiológicos reprodutivos	<i>COL16A1, TEAD3</i>	2	1,92		0	0
Regulação da atividade enzimática	<i>MAP2K3, SHC1</i>	2	1,92	<i>EGFR, GIT1, ADORA2B, EDNRB</i>	4	3,70
Regulação de processos celulares	<i>MACF1, SPTBN1, ESDN, MYO18A, MBD3, EIF2B5, TGFB1, HD, POLR2A, BIRC6, NFKBIA, APC, JIK, NF1, FBXL10, ASXL1, CCND2, YY1, GAS2L1, IL1B, MAP2K3, TEAD3, NCOR2, SHC1,</i>	29	27,88	<i>C6orf175, EGFR, GIT1, ZNF335, TMSB4Y, EBAG9, NFE2L2, ELF3, VDRIP, DNAJA3, ZNF297B, GTF2A2, LAMA4, HELSNF1, EIF3S3, UBE2V2, FUBP1, RGS2, TAF12, DSIPI, CALR, UBN1, HOXC9,</i>	26	24,07
Regulação de						

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em iLNFb + MCF10A / iLNFb	Nº Genes	%	Genes Hipoexpressos em iLNFb + MCF10A / iLNFb	Nº Genes	%
processos celulares (continuação)	<i>PPP1R9B, SUFU, TIMP1, SUPT6H, NRF</i>			<i>ZNF189, EMX2, SMARCE1</i>		
Regulação de processos fisiológicos	<i>MACF1, SPTBN1, ESDN, MYO18A, MBD3, EIF2B5, TGFB1, HD, POLR2A, BIRC6, NFKBIA, APC, NF1, FBXL10, ASXL1, CCND2, YY1, GAS2L1, IL1B, MAP2K3, TEAD3, NCOR2, SHC1, PPP1R9B, SUFU, TIMP1, SUPT6H, NRF</i>	28	26,92	<i>C6orf175, EGFR, CUGBP2, ZNF335, TMSB4Y, EBAG9, NFE2L2, ELF3, VDRIP, DNAJA3, ZNF297B, PPP1R12A, GTF2A2, LAMA4, HELSNF1, EIF3S3, UBE2V2, FUBP1, TAF12, DSIPI, CALR, UBN1, HOXC9, ZNF189, EMX2, SMARCE1</i>	26	24,07
Regulação do crescimento	<i>ESDN, SHC1, PPP1R9B</i>	3	2,88	<i>EBAG9</i>	1	0,93
Regulação do desenvolvimento	<i>DBN1</i>	1	0,96	<i>LAMA4</i>	1	0,93
Regulação negativa de processos biológicos	<i>MACF1, SPTBN1, ESDN, MYO18A, TGFB1, BIRC6, NFKBIA, APC, JIK, NF1, GAS2L1, IL1B, PPP1R9B, SUFU, TIMP1, NRF</i>	16	15,38	<i>EGFR, TMSB4Y, RGS2, ZNF189, SMARCE1, EDNRB</i>	6	5,56
Regulação positiva de processos biológicos	<i>HD, JIK, MAP2K3, SHC1, TIMP1</i>	5	4,81	<i>EGFR, ADORA2B</i>	2	1,85
Reprodução sexual	<i>TESK1</i>	1	0,96		0	0
Resposta a estímulo abiótico	<i>MVP, DNAJB1, CCL20</i>	3	2,88	<i>CKLFSF4</i>	1	0,93
Resposta a estímulo abiótico	<i>ITGB1, NFKBIA, CCL20, C3, YY1, IL1B, TRPC4AP, CD97, PRSS15</i>	9	8,65	<i>MGST2, B2M, MGST3, CTSC, C1QB, PROCR, IFNGR1, ADORA2B</i>	8	7,41
Resposta a estímulos endógenos	<i>RAD23A, POLS, Rif1, PRKDC</i>	4	3,85	<i>C6orf175, UBE2V2</i>	2	1,85
Resposta a estímulos externos	<i>ITGB1, ESDN, CCL20, C3, IL1B, PPP1R9B, CD97</i>	7	6,73	<i>CKLFSF4, PROCR, ADORA2B, PLSCR4</i>	4	3,70
Resposta ao stress	<i>ITGB1, RAD23A, ESDN, DNAJB1, NFKBIA, CCL20, C3, YY1, POLS, IL1B, Rif1, PRKDC, CD97, PRSS15</i>	14	13,46	<i>C6orf175, EGFR, MGST2, MGST3, SGK, C1QB, UBE2V2, PROCR, IFNGR1, ADORA2B, PLSCR4</i>	11	10,19

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em iLNFB + MCF10A / iLNFB	Nº Genes	%	Genes Hipoexpressos em iLNFB + MCF10A / iLNFB	Nº Genes	%
Genes com GO desconhecido	GPR56, MR3-GN0186-009-H05, CSGlcA-T, RAI, NMES1, MGC3047, EST1B, MGC2752, SF1, GDI1, PLEKHC1, NTE, LOC162427, YKT6, LRRC8, FBXO23, MGC21854, C16orf5, RBAF600, C22orf5, ADIPOR2, ZNF198, M-RIP, CM0-AN0004-497-F07, FLJ13111, MR0-HT0405-202-C03, C20orf22, SDBCAG84, MST4, SAE1, MGC15875, MGC16824, MBC2, D2S448, SH3GLB1, FASTK, FLJ13213, INPP5F, DGAT1, MCM2, RC3, LRP4			LOC84661, NY-REN-41, LR8, C6orf48, RNP24, FLJ11151, C1orf24, MGC5306, RC1-IT0013-022-C08, FLJ25476, DKFZP434I116, C6orf170, RC0-FN0025-021-E06, RC3-CI0043-024-D07, SPUF, APG12L, XTP7, KIAA1102, CYFIP2, LAF4, PGCP, MGC20460, C9orf74, PCTK3, C6orf49, HSPC121, C11orf15, FLJ13840, IFRG15, GLCE, PRSS11, LCN7, FLJ13456, MGC14798, FLJ11088, FLJ11588, RC0-BN0280-025-H02, C7orf35, HYPK, MDS025, C21orf59, NSE1, LOC51693, MGC955, C6orf168, Ufc1, CM0-HT1295-779-D06, SELS, C13orf24, FLJ23186, MGC2747, KIAA0644, C9orf19, MtFMT, MGC45714, BC-2, FLJ21156, Lrp2bp, MRPS28, PMP22, PRDX6, SAT2, MIR,		

Tabela 10. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos em fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos em co-cultura com células epiteliais malignas (MDA-MB-231), em relação a fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos isoladamente em cultura. Genes analisados usando-se o programa “Onto-Express”

Function Name	Genes Up regulated	Genes Down regulated	Unique Input Total	Unique Reference Total	Corrected P-Value
autophagy	<i>MAP1LC3B</i>	<i>APG12L</i>	2	2	0
Beta-tubulin folding	<i>TBCE, TBCD</i>		2	2	0
prostaglandin biosynthesis	<i>PTGIS</i>	<i>PTGS1</i>	2	2	0
endosome transport	<i>TOM1</i>	<i>LCN7</i>	2	3	0,001396
antigen processing, endogenous antigen via MHC class I	<i>TRPC4AP</i>	<i>B2M</i>	2	4	0,00492
protein targeting	<i>SEC61A1</i>	<i>SEC61A2</i>	2	4	0,005053
protein secretion	<i>SEC61A1</i>	<i>SEC61A2</i>	2	4	0,005193
excretion		<i>AQP3, ADORA2B, CLCN5</i>	3	10	0,011453
retrograde transport, Golgi to ER	<i>COPE, GBF1</i>		2	6	0,015852
activation of MAPK	<i>SHC1</i>	<i>ADORA2B</i>	2	6	0,016151
regulation of epidermal growth factor receptor activity	<i>SHC1</i>		1	2	0,016229
regulation of DNA repair		<i>UBE2V2</i>	1	2	0,016547
Intra-Golgi transport	<i>COPE, TOM1, TOM1L2</i>		3	11	0,016751
oligosaccharide metabolism	<i>GCS1</i>		1	2	0,016878
vesicle targeting	<i>YKT6</i>		1	2	0,017223
physiological process		<i>PTGS1</i>	1	2	0,017582
carbohydrate transport	<i>SLC35A4</i>		1	2	0,017956
neuromuscular junction development	<i>NRD1</i>		1	2	0,018346
heparin biosynthesis		<i>GLCE</i>	1	2	0,018754
keratinocyte differentiation		<i>PTGS1</i>	1	2	0,01918
mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	<i>NDUFB2</i>		1	2	0,019626
heparan sulfate proteoglycan biosynthesis		<i>GLCE</i>	1	2	0,020093
antigen presentation, endogenous antigen		<i>B2M</i>	1	2	0,020583
Lipid metabolism	<i>ADIPOR2, ALDH1A3, HADHA, LCAT, PTGIS</i>	<i>ACSL3, MGST3, PTGS1</i>	8	57	0,023384
Fatty acid biosynthesis	<i>FADS2, PTGIS</i>	<i>PTGS1</i>	3	14	0,031031
proton transport		<i>ATP5J2 ATP5L ATP5H</i>	3	14	0,031585
tetracycline transport		<i>SPIN1</i>	1	3	0,032027
peptide metabolism		<i>PGCP</i>	1	3	0,032454

Function Name	Genes Up regulated	Genes Down regulated	Unique Input Total	Unique Reference Total	Corrected P-Value
response to pathogenic bacteria		<i>IFNGR1</i>	1	3	0,032893
regulation of pH		<i>SLC9A7</i>	1	3	0,033343
peripheral nervous system development		<i>PMP22</i>	1	3	0,033806
anion transport	<i>SLC4A2</i>		1	3	0,034282
transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway	<i>TRIO</i>		1	3	0,034772
regulation of actin polymerization and/or depolymerization		<i>TMSB4Y</i>	1	3	0,035276
fatty acid desaturation	<i>FADS2</i>		1	3	0,035795
lipid biosynthesis	<i>ACLY</i>		1	3	0,036329
hormone-mediated signaling	<i>ADIPOR2</i>		1	3	0,03688
N-linked glycosylation	<i>ALG8, GCS1</i>		2	8	0,037219
base-excision repair		<i>OGG1</i>	1	3	0,037447
regulation of cell shape	<i>PLEKHC1</i>	<i>GLCE</i>	2	8	0,037861
regulation of muscle contraction		<i>PPP1R12A</i>	1	3	0,038032
translational initiation		<i>LGTN</i>	1	3	0,038636
purine nucleotide biosynthesis	<i>ADSS</i>		1	3	0,039259
double-strand break repair via nonhomologous end-joining		<i>KUB3</i>	1	3	0,039902
Cell organization and biogenesis	<i>DIAPH1</i>		1	3	0,040567
response to unfolded protein	<i>DNAJB1</i>	<i>TRA1</i>	2	9	0,040955
amino acid metabolism	<i>GCAT, EIF2B5, SLC7A2</i>		3	17	0,046963

Tabela 11. Genes diferencialmente expressos em fibroblastos originários de linfonodos comprometidos mantidos em co-cultura com células epiteliais MDA-MB-231, em relação a fibroblastos de linfonodos comprometidos mantidos isoladamente. Distribuição quanto à ontologia gênica em processos biológicos

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em iLNFB + MDA-MB-231 / iLNFB	Nº Genes	%	Genes Hipoexpressos em iLNFB + MDA-MB-231 / iLNFB	Nº Genes	%
Adesão celular	<i>DGCR2, ITGB1, TMEM8, EMILIN2, FBLN5</i>	5	6,67	<i>POSTN</i>	1	1,33
Coagulação	<i>FBLN5</i>	1	1,33	<i>PLSCR4</i>	1	1,33
Comportamento		0	0	<i>CKLFSF4, RALA</i>	2	2,67
Comunicação celular	<i>GJA1, LTBP3, ITGB1, IL1B, INPPL1, MAP2K3, MAP3K12, SHC1, PITPNC1, RANGAP1, LIMK1, TRIO, PIK3R3, SPHK1</i>	14	18,67	<i>RBPSUH, SNX5, MGST3, GIT1, SEL1L, RGS2, IFNGR1, GNG11, ADORA2B, ARHE, SNAPAP, PTPRC, RALA</i>	13	17,33
Crescimento celular	<i>SHC1, SPHK1</i>	2	2,67		0	0
Desenvolvimento de órgão	<i>GJA1, DGCR2, NRD1, SPHK1</i>	4	5,33	<i>POSTN, TPM2</i>	2	2,67
Desenvolvimento de sistema	<i>LIMK1</i>	1	1,33		0	0
Desenvolvimento tecidual	<i>No, genes</i>	0	0	<i>EVPL, KRT5</i>	2	2,67
Diferenciação celular		0	0	<i>PTGS1</i>	1	1,33
Homeostase	<i>ABCB6, IL1B</i>	2	2,67	<i>SLC9A7</i>	1	1,33
Interações fisiológicas entre organismos	<i>TEAD3</i>	1	1,33		0	0
Localização	<i>GJA1, JPHL1, LTBP3, TOM1, ABCB6, ALG8, COPE, VPS24, ACTN4, NRD1, SEC61A1, SCAMP3, AKT1S1, SLC4A2, TRPC4AP, SLC36A1, PITPNC1, DHCR24, PTGIS, GBF1, SLC35A4, LIMK1, SPHK1, NDUFB2, SLC39A7</i>	25	33,33	<i>COX5B, ATP5J2, JWA, SNX5, C1QB, SEC31L1, AQP3, FXD3, ATP5L, FUBP1, KCTD15, LGTN, SSR4, ARHE, SLC9A7, SEC61A2, TMSB4Y, SLC7A2, ATP5H, BLVRA, CLCN5, SNAPAP</i>	22	29,33
Locomoção	<i>ACTN4, NRD1, LIMK1, SPHK1</i>	4	5,33		0	0
Metabolismo	<i>CXXC1, GJA1, JPHL1, TBCD, FADS2, ZMPSTE24, MSC, TBCE, RAD23A, HADHA, SPTBN1, INPPL1, MAP2K3, ALG8, MBD3, EIF2B5, LCAT, CPZ, NRD1, MAP3K12, MAP1LC3B, AKT1S1, TEAD3, NCOR2, ALDH1A3, TRPC4AP, DNAJB1, RNF40, FBXW5, LMO7, DHCR24, ACLY, PTGIS, C14orf116, ELK1, ADSS, PRPF8, LIMK1, TRIO, PLA2G5,</i>	47	62,67	<i>RBPSUH, COX5B, MRPS21, ATP5J2, PTGS1, C6orf175, ASAH1, GTF2A2, TRA1, SDCCAG10, HELSNF1, SKP1A, NOLA3, METTL3, UBE2V2, SFRS7, MGST3, ACSL3, MMP1, ATP5L, FUBP1, LGTN, TAF12, TIEG2, PSMC6, PLOD2, ZNF335, TMSB4Y, SLC7A2, LSM3, ATP5H, CBR1, BLVRA, RPL15, NUDT5, RPS16, ZNF189, HNRPH3, OGG1, HNRPA2B1, EMX2,</i>	43	57,33

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em iLNFb + MDA-MB-231 / iLNFb	Nº Genes	%	Genes Hipoexpressos em iLNFb + MDA-MB-231 / iLNFb	Nº Genes	%
Metabolismo (continuação)	<i>NRF, GCAT, SPHK1, NDUFB2, TESK1, PTP4A1, TTL</i>			<i>SMARCE1, PTPRC</i>		
Morfogênese	<i>GJA1, DGCR2, SHC1, SPHK1</i>	4	5,33		0	0
Morte	<i>AXUD1, IL1B, SPHK1</i>	3	4	<i>NGFRAP1</i>	1	1,33
Percepção sensorial	<i>GJA1, PRPF8, DIAPH1</i>	3	4	<i>CKLFSF4, PDE6D</i>	2	2,67
Processos fisiológicos celulares	<i>CXXC1, GAS2L1, GJA1, JPHL1, LTBP3, TBCD, FADS2, ZMPSTE24, MSC, TOM1, TBCE, ABCB6, RAD23A, HADHA, AXUD1, IL1B, SPTBN1, INPPL1, MAP2K3, ALG8, MBD3, COPE, EIF2B5, VPS24, LCAT, CPZ, ACTN4, NRD1, SEC61A1, SCAMP3, MAP3K12, MAP1LC3B, AKT1S1, TEAD3, NCOR2, SLC4A2, ALDH1A3, SHC1, TRPC4AP, SLC36A1, DNAJB1, RNF40, FBXW5, LMO7, PITPNC1, DHCR24, ACLY, PTGIS, C14orf116, GBF1, ELK1, SLC35A4, ADSS, PRPF8, LIMK1, TRIO, CCND2, PLA2G5, NRF, GCAT, SPHK1, NDUFB2, SLC39A7, TESK1, PTP4A1, TTL, DIAPH1</i>	67	89,33	<i>RBPSUH, COX5B, MRPS21, ATP5J2, PTGS1, C6orf175, ASAH1, GTF2A2, TRA1, SDCCAG10, HELSNF1, JWA, SKP1A, SNX5, NOLA3, METTL3, C1QB, UBE2V2, SFRS7, NGFRAP1, SEC31L1, AQP3, ACSL3, MMP1, NS, FXYD3, ATP5L, FUBP1, KCTD15, LGTN, RGS2, TAF12, SSR4, TIEG2, ARHE, SLC9A7, PLOD2, ZNF335, SEC61A2, TMSB4Y, SLC7A2, LSM3, PLSCR4, ATP5H, BLVRA, CLCN5, SNAPAP, CDC27, RPL15, NUDT5, RPS16, ZNF189, HNRPH3, OGG1, HNRPA2B1, EMX2, SMARCE1, PTPRC</i>	58	77,33
Processos fisiológicos organismal	<i>GJA1, ITGB1, IL1B, TEAD3, TRPC4AP, PRPF8, FBLN5, SPHK1, DIAPH1</i>	9	12	<i>COX5B, CKLFSF4, PPP1R12A, PTGS1, PDE6D, C1QB, B2M, MGST3, AQP3, ADORA2B, PLSCR4, CLCN5, SNAPAP</i>	13	17,33
Processos fisiológicos reprodutivos	<i>TEAD3</i>	1	1,33		0	0
Regulação da atividade enzimática	<i>MAP2K3, SHC1</i>	2	2,67	<i>GIT1, ADORA2B</i>	2	2,67
Regulação de processos celulares	<i>CXXC1, GAS2L1, GJA1, LTBP3, MSC, IL1B, SPTBN1, MAP2K3, MBD3, EIF2B5, TEAD3, NCOR2, SHC1, C14orf116, ELK1, CCND2, NRF, SPHK1</i>	18	24	<i>RBPSUH, C6orf175, GTF2A2, HELSNF1, UBE2V2, GIT1, NS, FUBP1, RGS2, TAF12, TIEG2, ZNF335, TMSB4Y, ZNF189, EMX2, SMARCE1</i>	16	21,33
Regulação de	<i>CXXC1, GAS2L1,</i>	17	22,67	<i>RBPSUH, PPP1R12A,</i>	15	20

Classificação Ontológica em Processos Biológicos	Genes Hiperexpressos em iLNFb + MDA-MB-231 / iLNFb	Nº Genes	%	Genes Hipoexpressos em iLNFb + MDA-MB-231 / iLNFb	Nº Genes	%
processos fisiológicos	<i>LTBP3, MSC, IL1B, SPTBN1, MAP2K3, MBD3, EIF2B5, TEAD3, NCOR2, SHC1, C14orf116, ELK1, CCND2, NRF, SPHK1</i>			<i>C6orf175, GTF2A2, HELSNF1, UBE2V2, NS, FUBP1, TAF12, TIEG2, ZNF335, TMSB4Y, ZNF189, EMX2, SMARCE1</i>		
Regulação do crescimento	<i>SHC1, SPHK1</i>	2	2,67		0	0
Regulação negativa de processos biológicos	<i>GAS2L1, IL1B, SPTBN1, NRF, SPHK1</i>	5	6,67	<i>RBPSUH, RGS2, TIEG2, TMSB4Y, ZNF189, SMARCE1</i>	6	8
Regulação positiva de processos biológicos	<i>GJA1, MAP2K3, SHC1, SPHK1</i>	4	5,33	<i>ADORA2B</i>	1	1,33
Reprodução sexual	<i>TESK1</i>	1	1,33		0	0
Resposta a estímulo biótico	<i>ITGB1, IL1B, TRPC4AP</i>	3	4	<i>C1QB, B2M, MGST3, IFNGR1, ADORA2B</i>	5	6,67
Resposta a estímulos abióticos	<i>MVP, DNAJB1</i>	2	2,67	<i>CKLFSF4, TRA1, RALA</i>	3	4
Resposta a estímulos endógenos	<i>RAD23A, C14orf116</i>	2	2,67	<i>C6orf175, UBE2V2, OGG1</i>	3	4
Resposta a estímulos externos	<i>ITGB1, IL1B, FBLN5</i>	3	4	<i>CKLFSF4, ADORA2B, PLSCR4, RALA</i>	4	5,33
Resposta ao estresse	<i>ITGB1, RAD23A, IL1B, DNAJB1, C14orf116, FBLN5</i>	6	8	<i>C6orf175, TRA1, C1QB, UBE2V2, MGST3, IFNGR1, ADORA2B, PLSCR4, OGG1</i>	9	12
Genes com GO desconhecido	<i>MGC2752, CSGlcA-T, SF1, EST1B, LOC162427, YKT6, FBXO23, QV3-HT1017-481-E02, SPINL, TOM1L2, SDBCAG84, ADIPOR2, SAE1, PLEKHC1, SLB, MGC16824, M-RIP, ECG2, HSPC182, C16orf5, FASTK, C22orf5, C6orf85, FLJ32332, FAIM2, MR0-HT0405-202-C03, MGC21854, GCS1, NTE, ASAM, KIDINS220, FLJ13111, NEK9, DGAT1, ARFGAP1,</i>			<i>LOC84661,, NY-REN-41,, RNP24,, FLJ11151,, MGC5306,, RC1-IT0013-022-C08,, C6orf170,, SPUF,, HYPK,, DKFZP434I116,, FLJ25476,, GLCE,, KUB3,, FLJ11088,, C6orf49,, LCN7,, MDS025,, MGC955,, MGC20460,, C7orf35,, RC0-FN0025-021-E06,, PGCP,, PCTK3,, LAF4,, FLJ13456,, XTP7,, MGC14798,, APG12L,, VMP1,, MIG-6,, C11orf15,, FLJ21156,, FLJ20160,, CALM2,, PMP22,, TRB2</i>		

Tabela 12. Genes diferencialmente expressos em fibroblastos derivados de linfonodos não comprometidos, após co-cultura com as células MCF10A e MDA-MB-231. Estes genes foram comumente modulados por influência de ambos os tipos de células epiteliais

Genes modulados em fibroblastos de linfonodos não comprometidos co-cultivados com células epiteliais	Genes hiperexpressos em n-iLNFb + Células epiteliais	Genes hiperexpressos em n-iLNFb + Células epiteliais
<p>Genes comuns</p>	<p><i>BIRC6, C19orf6, DUSP11, EBI3, FGFR2, FLJ20508, FLJ32028, GSDML, IL4R, JAK2, KIAA1194, MAIL, PIP3-E, PM2-ST0303-002-E07, PRO1073, QV0-GN0140-430-B05, RC0-GN0090-032-G05, ROCK2, SLC9A8, SRGAP1, TPM1, TRIO</i></p>	<p><i>APP, BLVRA, C14orf123, C6orf170, C6orf48, CHPT1, CIB1, COX5B, DARS, DIAPH2, DKFZP434F091, DKFZP434K046, DSIPI, EIF3S3, FLJ11151, FLJ20516, FLJ21977, FLOT1, FRAS1, GC20, GLUL, GPM6B, GPR35, GSTA4, GTF2A2, H326, HAX1, HELSNF1, HIRIP5, KUB3, LAF4, LGTN, LITAF, LOC84661, MANBAL, MMP1, MRPL22, MRPL24, MRPL39, MRPS21, NDUFA6, NOLA3, NUDT5, PCTK3, PDCD6, PGCP, PHYH, PPIE, PS1D, PSMA5, RFXANK, RIT1, SAT2, SKP1A, TMSB4Y, UBE2L6, XTP7</i></p>

Tabela 13. Genes diferencialmente expressos em fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos, após co-cultura com as células MCF10A e MDA-MB-231. Estes genes foram comumente modulados por influência de ambos os tipos de células epiteliais

Genes modulados em fibroblastos de linfonodos comprometidos co-cultivados com células epiteliais	Genes hiperexpressos em iLNFB + Células epiteliais	Genes hiperexpressos em iLNFB + Células epiteliais
Genes comuns	ADIPOR2, ADSS, ALDH1A3, ANKRD11, BLCAP, C16orf5, C22orf5, CCND2, COPE, COTL1, CPZ, CSGlcA-T, DGAT1, DHCR24, DIAPH1, DNAJB1, EIF2B5, EST1B, FADS2, FASTK, FBXO23, FBXW5, FLJ13111, FNDC4, GAS2L1, GBF1, HADHA, IL1B, INPPL1, ITGB1, KIAA1600, LCAT, LIMK1, LMO7, LOC162427, MAP1LC3B, MAP2K3, MAP3K12, MBD3, MGC16824, MGC21854, MGC2752, MR0-HT0405-202-C03, M-RIP, MVP, NCOR2, NDUFB2, NPD007, NRD1, NRF, NTE, OPTN, PLA2G5, PLEKHC1, PLXNB2, PRPF8, PTGIS, PTP4A1, RAD23A, RANGAP1, RNF40, SAE1, SCAMP3, SDBCAG84, SF1, SHC1, SLC35A4, SLC36A1, SLC39A7, SLC4A2, SPTBN1, TBCE, TEAD3, TESK1, TEX261, TRIO, TRPC4AP, TTL, WDR13, YKT6, ZMPSTE24	ADORA2B, APG12L, AQP3, ARHE, ASAH1, ATP5H, ATP5J2, ATP5L, B2M, C11orf15, C1QB, C6orf170, C6orf175, C6orf49, C7orf35, CBR1, CDC27, CKLFSF4, COPS6, DDIT4, DKFZP434F091, DKFZP434I116, EMX2, EVPL, FLJ11088, FLJ11151, FLJ13456, FLJ21156, FLJ25476, FUBP1, GIT1, GLCE, GNG11, GTF2A2, HELSNF1, HEM1, HN1, HNRPA2B1, HYPK, IFNGR1, JWA, KCTD15, LAF4, LCN7, LGTN, LOC84661, LSM3, LXN, MDS025, METTL3, MGC14798, MGC20460, MGC5306, MGC955, MGST3, MMP1, MRPL37, MRPS21, NGFRAP1, NOLA3, NUDT5, NY-REN-41, PCTK3, PGCP, PLSCR4, PMP22, PPP1R12A, PSMC6, PTGS1, RC0-FN0025-021-E06, RC1-IT0013-022-C08, RGS2, RNP24, RPL15, RPS16, SDCCAG10, SEC31L1, SEC61A2, SEL1L, SFRS7, SKP1A, SLC7A2, SMARCE1, SNX5, SPUF, SSR4, TAF12, TMSB4Y, TPM2, TTYH3, UBE2V2, XTP7, ZCCHC7, ZNF189, ZNF335,

8. Referências

Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, & Dopazo J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* 2004; 20: 578-580.

Archer FR, Doherty P, Collins D, Bolsover SR. CAMs and FGF cause a local submembrane calcium signal promoting axon outgrowth without a rise in bulk calcium concentration. *Eur J Neurosci.* 1999; 11:3565-73.

Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell.* 1996; 86:263-74.

Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature.* 1990; 348:699-704.

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

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 2004; 432:332-7.

Bissell MJ, Weaver VM, Lelievre SA, Wang F, Petersen OW, Schmeichel KL. Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer Res.* 1999; 59:1757-1764s.

Bisson C, Blacher S, Polette M, Blanc JF, Kebers F, Desreux J, Tetu B, Rosenbaum J, Foidart JM, Birembaut P, Noel A. Restricted expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase by myofibroblasts adjacent to human breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2003;105:7-13.

Biswas D K, Reddy PV, Pickard M, Makkad B, Pettit N, Pardee AB. Calmodulin is essential for estrogen receptor interaction with its motif and activation of responsive promoter. *J Biol Chem* 1998; 273:33817–33824.

Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*. 2005;120:303-13.

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.

Buchanan FG, Gorden DL, Matta P, Shi Q, Matrisian LM, DuBois RN. Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:1492-7.

Camps JL, Chang SM, Hsu TC, Freeman MR, Hong SJ, Zhau HE, von Eschenbach AC, Chung LWK. Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990; 87: 75-9.

Cavdar KE, BurkhartW, BlackburnK, Moseley A, Spremulli LL. The small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Identification of the full complement of ribosomal proteins present. *J Bio. Chem*. 2001; 276:19363-74.

Chauhan H, Abraham A, Phillips JR, Pringle JH, Walker RA, Jones JL. There is more than one kind of myofibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ, and invasive breast lesions. *J Clin Pathol*. 2003 ; 56:271-6.

Chen A, Ganor Y, Rahimipour S, Ben-Aroya N, Koch Y, Levite M. The neuropeptides GnRH-II and GnRH-I are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression, adhesion, chemotaxis and homing to specific organs. *Nature Med*. 2002; 8: 421-1426.

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.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420:860-7.

Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N, Kau SW, Broglio K, Theriault RL, Valero V, Buzdar AU, Kuerer H, Bucholz TA, Hortobagyi GN. Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. *J Clin Oncol*. 2005; 23:41-8.

Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ, Ricke WA. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer*. 2003; 107:1-10. Review.

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.

Dalziel M, Dall'Olio F, Mungul A, Piller V, Piller F. Ras oncogene induces beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase (ST6Gal I) via a RalGEF-mediated signal to its housekeeping promoter. *Eur J Biochem*. 2004; 271:3623-34.

Debant A, Serra-Pages C, Seipel K, O'Brien S, Tang M, Park SH, Streuli M. The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 1996; 93: 5466-71.

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

Dýaz J, G Baier, G Martýnez-Mekler, N Pastor. Interaction of the IP₃ – Ca²⁺ and the FGF-MAPK signaling pathways in the *Xenopus laevis* embryo: a qualitative approach to the mesodermal induction problem. *Biophysical Chemistry*. 2002, 97:55–72.

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

Fecchi K, Volonte D, Hezel MP, Schmeck K, Galbiati F. Spatial and temporal regulation of GLUT4 translocation by flotillin-1 and caveolin-3 in skeletal muscle cells. *FASEB J*. 2006; 20:705-7.

Feschotte C, Osterlund MT, Peeler R, Wessler SR. DNA-binding specificity of rice mariner-like transposases and interactions with Stowaway MITEs. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33:2153-65.

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

Fisher SE, van Bakel I, Lloyd SE, Pearce SH, Thakker RV, Craig IW. Cloning and characterization of CLCN5, the human kidney chloride channel gene implicated in Dent disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Genomics*. 1995; 29:598-606

Fischer U, Struss AK, Hemmer D, Michel A, Henn W, Steudel WI, Meese E. PHF3 expression is frequently reduced in glioma. *Cytogenet Cell Genet*. 2001; 94:131-6.

Florio SK, Prusti RK, Beavo JA. Solubilization of membrane-bound rod phosphodiesterase by the rod phosphodiesterase recombinant delta subunit. *J Biol Chem*. 1996; 271:24036-47.

Florl AR, Lower R, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA. DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br J Cancer*. 1999; 80:1312-21.

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.

Fukata M, Nakagawa M & Kaibuchi K. Roles of Rho family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin. Cell Biol*. 2003; 15: 590–97.

Fukino K, Shen L, Matsumoto S, Morrison CD, Mutter GL, Eng C. Combined total genome loss of heterozygosity scan of breast cancer stroma and epithelium reveals multiplicity of stromal targets. *Cancer Res*. 2004; 64:7231-6.

Ge L, Shenoy SK, Lefkowitz RJ, DeFea K. Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem*. 2004; 279:55419-24.

Gingras R, Richard C, El-Alfy M, Morales CR, Potier M, Pshezhetsky AV. Purification, cDNA cloning, and expression of a new human blood plasma glutamate carboxypeptidase homologous to N-acetyl-aspartyl-alpha-glutamate carboxypeptidase/prostate-specific membrane antigen. *J Biol Chem*. 1999; 274:11742-50.

- Girnita L, Shenoy SK, Sehat B, Vasilcanu R, Girnita A, Lefkowitz RJ, Larsson O. β -Arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase. *J Biol Chem*. 2005; 280:24412-9.
- Gold LI. The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog*. 1999; 10:303-60. Review.
- Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279: 509–14.
- 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. *Am J Pathol*. 2000; 156:1701-10.
- Hauptmann S, Schmitt WD. Transposable elements--is there a between evolution and cancer?. *Med Hypotheses*. 2006; 66:580-91.
- Hiwatari M, Taki T, Taketani T, Taniwaki M, Sugita K, Okuya M, Eguchi M, Ida K, Hayashi Y. Fusion of an AF4-related gene, LAF4, to MLL in childhood acute lymphoblastic leukemia with t(2;11)(q11;q23) *Oncogene*. 2003; 22:2851-55.
- Hsu DR, Chuang PT, Meyer BJ. DPY-30, a nuclear protein essential early in embryogenesis for *Caenorhabditis elegans* dosage compensation. *Development*. 1995; 121:3323-34.
- Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, Eisenbach L, Kimchi A. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature*. 1997; 390:180-4.
- Ishibashi T, Hayakawa H, Sekiguchi M. A novel mechanism for preventing mutations caused by oxidation of guanine nucleotides. *EMBO Rep*. 2003; 4:479-83.
- Ishiguro H, Tsunoda T, Tanaka T, Fujii Y, Nakamura Y, Furukawa Y Identification of AXUD1, a novel human gene induced by AXIN1 and its reduced expression in human carcinomas of the lung, liver, colon and kidney. *Oncogene*. 2001; 20:5062-6
- Jakoi ER, Brown AL, Ho YS, Snyderman R. Molecular cloning of the cDNA for ligatin. *J Cell Sci*. 1989; 93:227-32.

Jin W, McCutcheon IE, Fuller GN, Huang ES, Cote GJ. Fibroblast growth factor receptor-1 alpha-exon exclusion and polypyrimidine tract-binding protein in glioblastoma multiforme tumors. *Cancer Res.* 2000; 60:1221-4.

Jones JL, Shaw JA, Pringle JH, Walker RA. Primary breast myoepithelial cells exert an invasion-suppressor effect on breast cancer cells via paracrine down-regulation of MMP expression in fibroblasts and tumour cells. *J Pathol.* 2003; 201:562-72.

Jones RD, Thompson JS, Morice AH. The effect of hydrogen peroxide on hypoxia, prostaglandin F2 alpha and potassium chloride induced contractions in isolated rat pulmonary arteries. *Pulm Pharmacol Ther.* 1997; 10:37-42.

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. Histologia Básica. 1999; 9ª Edição, Guanabara Koogan.

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6:392-401. Review.

Khatri P, Draghici S. Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics.* 2005; 21:3587-95.

Kim YG, Sohn EJ, Seo J, Lee KJ, Lee HS, Hwang I, Whiteway M, Sacher M, Oh BH. Crystal structure of bet3 reveals a novel mechanism for Golgi localization of tethering factor TRAPP. *Nat Struct Mol Biol.* 2005; 12:38-45.

Korkola JE, DeVries S, Fridlyand J, Hwang ES, Estep AL, Chen YY, Chew KL, Dairkee SH, Jensen RM, Waldman FM. Differentiation of lobular versus ductal breast carcinomas by expression microarray analysis. *Cancer Res.* 2003; 63:7167-75.

Kraus S, Naor Z, Seger R. Intracellular signaling pathways mediated by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Arch Med Res.* 2001; 32:499-509.

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; 98:12072-7.

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 ; 101:4966-71.

Lai A, Sarcevic B, Prall OW, Sutherland RL. Insulin/insulin-like growth factor-I and estrogen cooperate to stimulate cyclin E-Cdk2 activation and cell Cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of cyclin E and p21(WAF1/Cip1). *J Biol Chem.* 2001; 276:25823-33.

Lazard D, Sastre X, Frid MG, Glukhova MA, Thiery JP, Koteliansky VE. Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:999-1003.

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

Lee 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 MF, Guillot C, Crepin M, Saez S. Influence of tumor derived fibroblasts and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on growth of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 1995; 33: 189-97.

Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, Qin J, Gu W. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature.* 2002; 416:648-53

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.

Lin C., Bissel M. Multifaceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* 1993; 7: 737-743.

Mably JD, Mohideen MA, Burns CG, Chen JN, Fishman MC. Heart of glass regulates the concentric growth of the heart in zebrafish. *Curr Biol.* 2003; 13:2138-47.

Markovtsov V, Nikolic J M, Goldman J A, Turck C W, Chou MY, Black D L. Cooperative assembly of an hnRNP complex induced by a tissue-specific homolog of polypyrimidine tract binding protein. *Molec. Cell. Biol.* 2000; 20: 7463-79.

Matrisian LM, Cunha GR, Mohla S. Epithelial-stromal interactions and tumor progression: meeting summary and future directions. *Cancer Res.* 2001; 61:3844-6.

Mawson A, Lai A, Carroll JS, Sergio CM, Mitchell CJ, Sarcevic B. Estrogen and insulin/IGF-1 cooperatively stimulate cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of c-Myc and cyclin D1. *Mol Cell Endocrinol.* 2005; 229:161-73.

Menashi S, Serova M, Ma L, Vignot S, Mourah S, Calvo F. Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 2003; 63:7575-80

Michno A, Skibowska A, Raszeja-Specht A, Cwikowska J, Szutowicz A. The role of adenosine triphosphate citrate lyase in the metabolism of acetyl coenzyme a and function of blood platelets in diabetes mellitus. *Metabolism.* 2004; 53:66-72.

Ministério da Saúde; INCA; Brasil; 2005.

Nagai MA, Da Ros N, Neto MM, de Faria Junior SR, Brentani MM, Hirata R Jr, Neves EJ. Gene expression profiles in breast tumors regarding the presence or absence of estrogen and progesterone receptors. *Int J Cancer.* 2004; 111:892-9.

Nakayama M, Amano M, Katsumi A, Kaneko T, Kawabata S, Takefuji M, Kaibuchi K. Rho-kinase and myosin II activities are required for cell type and environment specific migration. *Genes Cells.* 2005; 10:107-17.

- Naor Z, Harris D, Shacham S. Mechanism of GnRH receptor signaling: combinatorial cross-talk of Ca²⁺ and protein kinase C. *Front Neuroendocrinol.* 1998; 19:1-19.
- Neo SY, Zhang Y, Yaw LP, Li P, Lin SC. Axin-induced apoptosis depends on the extent of its JNK activation and its ability to down-regulate beta-catenin levels. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 272:144-50.
- 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.
- Okuda T, Cleveland JL, Downing JR: PCTAIRE-1 and PCTAIRE-3, two members of a novel cdc2/CDC28-related protein kinase gene family. *Oncogene.* 1992; 7: 2249-58.
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* 1999; 59:5002-11.
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell.* 2005; 121:335-48.
- Orsetti B, Nugoli M, Cervera N, Lasorsa L, Chuchana P, Ursule L, Nguyen C, Redon R, du Manoir S, Rodriguez C, Theillet C. Genomic and expression profiling of chromosome 17 in breast cancer reveals complex patterns of alterations and novel candidate genes. *Cancer Res.* 2004; 64:6453-60.
- 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.
- Pogacic V, Dragon F, Filipowicz W. Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20: 9028-40.

Rahman L, Bliskovski V, Kaye FJ, Zajac-Kaye M. Evolutionary conservation of a 2-kb intronic sequence flanking a tissue-specific alternative exon in the PTBP2 gene. *Genomics*. 2004; 83:76-84.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003; 302:1704-9.

Rodriguez-Mora, OG, . LaHair MM, . McCubrey JA, Franklin RA. Calcium/calmodulin-dependent kinase I and calcium/calmodulin-dependent kinase kinase participate in the control of cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells, *Cancer Res*. 2005 ; 65:5408–5416.

Rouyer N, Wolf C, Chenard MP, Rio MC, Chambon P, Bellocq JP, Basset P. Stromelysin-3 gene expression in human cancer: an overview. *Invasion Metastasis*. 1994-1995; 14:269-75

Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000; 132:365-86.

Sachdev D and Yee D. The IGF system and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2001; 8:197–209.

Sadlonova A, Novak Z, Johnson MR, Bowe DB, Gault SR, Page GP, Thottassery JV, Welch DR, Frost AR. Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional in vitro co-culture. *Breast Cancer Res*. 2005; 7:R46-59.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001; 344:783-92.

Seipel K, Medley QG, Kedersha NL, Zhang XA, O'Brien SP, Serra-Pages C, Hemler ME, Streuli M. Trio amino-terminal guanine nucleotide exchange factor domain expression promotes actin cytoskeleton reorganization, cell migration and anchorage-independent cell growth. *J Cell Sci*. 1999; 112:1825-34.

Shekhar MPV, Wrdell J, Santner SJ, Pauley RJ, Tait L. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation:

Implications for tumor development and progression. *Cancer Research*. 2001; 61: 1320-26.

Singer CF, Kronsteiner N, Marton E, Kubista M, Cullen KJ, Hirtenlehner K, Seifert M, Kubista E. MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. *Breast Cancer Res Treat*. 2002; 72:69-77.

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; 65:1129-35.

Soomro S, Shousha S, Taylor P, Shepard HM, Feldmann M. c-erbB-2 expression in different histological types of invasive breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 1991; 44:211-4

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.

Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullahy SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalon DK, Muzny DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettelman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madan A, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Blakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Krzywinski MI, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Marra MA; Mammalian Gene Collection Program Team. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:16899-903.

Suter CM, Martin DI, Ward RL. Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. *Int J Colorectal Dis*. 2004; 19:95-101.

Takai D, Yagi Y, Habib N, Sugimura T, Ushijima T. Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. *Jpn J Clin Oncol*. 2000; 30:306-9.

Tlsty TD. Stromal cells can contribute oncogenic signals *Semin Cancer Biol*. 2001; 11:97-104.

Torikai H, Akatsuka Y, Miyazaki M, Warren EH 3rd, Oba T, Tsujimura K, Motoyoshi K, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. A novel HLA-A*3303-restricted minor histocompatibility antigen encoded by an unconventional open reading frame of human TMSB4Y gene. *J Immunol*. 2004; 173:7046-54.

Varis A, Wolf M, Monni O, Vakkari ML, Kokkola A, Moskaluk C, Frierson H Jr, Powell SM, Knuutila S, Kallioniemi A, El-Rifai W. Targets of gene amplification and overexpression at 17q in gastric cancer. *Cancer Res*. 2002; 62:2625-9.

Wang TN, Albo D, Tuszynski GP. Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloproteinase-9 production. *Surgery*. 2002; 132:220-5.

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.

Wiseman B, Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. Review. *Science*. 2002; 296: 1046-9.

Yazhou C, Wenlv S, Weidong Z, Licun W . Clinicopathological significance of stromal myofibroblasts in invasive ductal carcinoma of the breast.. *Tumour Biol*. 2004; 25:290-5.

Yoshizuka N, Moriuchi R, Mori T, Yamada K, Hasegawa S, Maeda T, Shimada T, Yamada Y, Kamihira S, Tomonaga M, Katamine S. An alternative transcript derived from the trio locus encodes a guanosine nucleotide exchange factor with mouse cell-transforming potential. *J Biol Chem*. 2004; 279:43998-4004.

Zhang T, Wong SH, Tang BL, Xu Y, Peter F, Subramaniam VN, Hong W. The mammalian protein (rbet1) homologous to yeast Bet1p is primarily associated with the pre-Golgi intermediate compartment and is involved in vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol.* 1997; 139:1157-68.

Zhang Y, Neo SY, Wang X, Han J, Lin SC. Axin forms a complex with MEKK1 and activates c-Jun NH(2)-terminal kinase/stress-activated protein kinase through domains distinct from Wnt signaling. *J Biol Chem.* 1999; 274:35247-54.

Zheng M, Simon R, Mirlacher M, Maurer R, Gasser T, Forster T, Diener PA, Mihatsch MJ, Sauter G, Schraml P. TRIO amplification and abundant mRNA expression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Am J Pathol.* 2004; 165:63-9.