Cintia Milani

**Expressão gênica diferencial das células estromais
obtidas de medula óssea na presença ou ausência de
célula tumoral oculta em pacientes
com câncer de mama**

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Prof. Dra. Maria Aparecida Azevedo
Koike Folgueira

São Paulo

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Milani, Cintia

Expressão gênica diferencial das células estromais obtidas de medula óssea na presença ou ausência de célula tumoral oculta em pacientes com câncer de mama / Cintia Milani. -- São Paulo, 2006.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Radiologia.

Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Maria Aparecida Azevedo Koike Figueira.

Descritores: 1.Neoplasias mamárias 2.Medula Óssea 3.Células estromais
4.Queratina/análise 5.Expressão gênica 6.Análise de sequência com séries de
oligonucleotídeos/métodos

USP/FM/SBD-298/06

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores que de alguma forma podem utilizar as informações aqui contidas de modo a beneficiar ou mesmo dar alguma esperança àquelas mulheres que sofrem, aprendem e até se re-descobrem através do câncer.

Agradecimentos

À minha tão amada família, sustentáculo de minha vida, que me ama e me compreende em todos os momentos. E também aos amigos que são uma extensão de minha família.

À minha admirada orientadora Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira, mulher de fibra, exemplo de dedicação, conhecimento e ensino, pessoa esta que nunca me desamparou e que abriu o meu caminho rumo ao conhecimento.

À professora Maria Mitzi Brentani exemplo ideal de conhecimento e dedicação cuja caminhada abriu os caminhos de muitas pessoas aqui citadas.

À querida Lúcia, Maria Lúcia Hirata Katayama, companheira de todas as horas a quem nunca falta disposição, dedicação, conhecimento, carinho, e principalmente, amor.

Ao dedicado Leonardo Gomes da Fonseca, pessoa cujas características e aptidões superaram em muito as atribuições de estagiário.

À querida Ana Paula Santana de Abreu, companheira sem igual a quem tive o prazer de poder trabalhar.

À Professora Dirce Maria Carraro que abriu as portas de seu Laboratório de Expressão Gênica no Instituto Ludwig de São Paulo para mais uma etapa do nosso trabalho. E dentro deste à Louise Danielle de Carvalho Motta, Elen Pereira Bastos e Nádia Pereira de Castro.

À professora Helena Brentani do Laboratório de Bioinformática do Hospital do Câncer da Fundação Antônio Prudente. E dentro deste ao César Henrique Torres pela paciência empreendida nas minhas infindáveis dúvidas, também ao Eduardo Aranha e Luiz Paulo Camargo.

Às companheiras Ticiane Thomazine Benvenuti, Rosângela Portilho da Costa Santos, Patrícia Bortman Rozenchan, Suzana Terumi Honda, Renata Afonso Sobral e Lúcia Valéria Teixeira da Silva, pessoas sempre importantes nos diversos momentos desta jornada.

À Rosimeire Aparecida Roela por ter sido a minha “pedra fundamental” no microambiente medular.

À Simone Vieira da Costa, Flávia Rotea Mangone e Iran Amorim da Silva amigos que tornam o dia a dia mais agradável.

À Graziela Ravacci por todos os momentos compartilhados.

Às colegas Simone Maistro, Fátima Solange Pasini, Karen Brunialti, Cristina Campofiorito, por serem uma extensão do nosso grupo de trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Adesão Celular, Andréa Hanada Otake, Mara Souza Junqueira, Luciana Nogueira de Souza Andrade, Patrícia Luiza da Costa, Verônica Rodrigues Teixeira e Guilherme Francisco, companhias agradáveis e sempre dispostas a ajudar.

Aos novatos Mateus de Camargo Barros Filho, Paula Cravanzola Fernandes, Ana Paula Garey, Bárbara dos Santos Nunes, Bruno Ferencz Cadima, LÍlian Pires Barbeta.

À Maria José Gonçalves Benevides pelo carinho, dedicação e auxílio nas questões administrativas e também à Maria Cristina Piñero Grandal pelo cuidado e disposição com que tratou da parte ilustrativa deste trabalho.

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

Ao Jair Cláudio Alves Oliveira e Willame Silva Macêdo por terem sido prestativos quanto ao trato da cultura de células.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) por ter financiado a minha bolsa de mestrado.

Enfim, à todos aqueles que me auxiliaram a galgar os degraus do conhecimento científico e também à aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a difícil escalada dos degraus da vida.

[Ela canta, pobre ceifeira]

Ela canta, pobre ceifeira,
Julgando-se feliz talvez;
Canta, e ceifa, e a sua voz, cheia
De alegre e anônima viuvez,

Ondula como um canto de ave
No ar limpo como um limiar,
E há curvas no enredo suave
Do som que ela tem a cantar.

Ouvi-la alegre e entristece,
Na sua voz há o campo e a lida,
E canta como se tivesse
Mais razões para cantar que a vida.

Ah, canta, canta sem razão!
O que em mim sente 'stá pensando.
Derrama no meu coração
a tua incerta voz ondeando!

Ah, pode ser tu, sendo eu!
Ter a tua alegre inconsciência,
E a consciência disso! Ó céu!
Ó campo! Ó canção! A ciência

Pesa tanto e a vida é tão breve!
Entra por mim dentro! Tornai
Minha alma a vossa sombra leve!
Depois, levando-me, passai!

Fernando Pessoa

Sumário

Lista de Abreviaturas	ix
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas.....	xv
Resumo	xvi
Summary	xvii
1. Introdução	1
2. Objetivos específicos	14
3. Métodos	16
3.1 Casuística	17
3.2 Transporte das Amostras	19
3.3 Medula Óssea	19
3.3.1 Obtenção da camada de mononucleares para cultura primária de células estromais	20
3.3.2 Condições de cultivo das células estromais	21
3.3.3 Cultura de célula epitelial mamária.....	22
3.3.4 Caracterização imunocitoquímica da cultura primária de células estromais	23
3.3.5 Obtenção de camada de mononucleares para Reação em Cadeia da Polimerase	24
3.4 Extração do RNA total.....	25
3.5 Reação de Transcriptase Reversa (RT) para obtenção de cDNA....	26
3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação de cDNA.....	27
3.7 Amplificação do mRNA	30
3.8 Hibridização em lâminas de vidro.....	35
3.9 Leitura dos dados e Análise Estatística.....	37

4. Resultados	39
4.1 Padronização da técnica de <i>Nested-PCR</i> para a detecção da expressão de citoqueratina 19 (CK 19) em linhagens celulares diluídas em células mononucleares de sangue periférico	40
4.2 Presença de células metastáticas ocultas na medula óssea de pacientes com tumores de mama (CK19).	42
4.3 Obtenção de cultura primária de células estromais	45
4.4 Caracterização imunocitoquímica da cultura primária de células estromais	46
4.5 Obtenção do RNA amplificado	49
4.6 Hibridização	52
4.7 Perfil da expressão gênica diferencial entre células estromais oriundas de medula óssea comprometida por micrometástases em relação às células estromais oriundas de medula óssea não comprometida	58
5. Discussão	63
6. Conclusões	74
7. Anexo	76
8. Referências	78
Apêndice	

Lista de Abreviaturas

ATCC	– American Type Culture Collection
aRNA	– ácido ribonucleico amplificado
BSA	– soro albumina bovina
CD45	– antígeno comum leucocitário (glicoproteína transmembrana expressa em células de origem hematopoiéticas)
cDNA	– DNA complementar
CEA	– antígeno carcinoembrionário
CK19	– citoqueratina 19 (filamento intermediário do citoesqueleto de células epiteliais)
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
dNTP	– desoxiribonucleotídeos
DO	– densidade ótica
DTT	– ditioneitol
EDTA	– ácido etileno diamino tetracético
FM	– fibroblasto medular
FMN	– célula estromal oriunda de medula normal

FMT	– célula estromal oriunda de medula contendo célula tumoral
Hb4a	– linhagem celular epitelial mamária humana derivada de mamoplastia imortalizada pela transfecção do antígeno T grande do vírus SV40
HGF	– fator de crescimento de hepatócito
Ki 67	– marcador de proliferação celular
M	– molar
MCF-7	– linhagem celular epitelial mamária humana bem diferenciada derivada de infusão pleural de adenocarcinoma
MDA-MB-231	– linhagem celular epitelial mamária humana derivada de infusão pleural de adenocarcinoma
MEC	– matriz extracelular
µg	– microgramas
µl	– microlitros
µM	– micromolar
ml	– mililitro
mM	– milimolar
MMP-9	– metaloprotease da matriz do tipo 9
MNC	– células mononucleares obtidas de sangue periférico de doador sadio sem câncer
MOPS ácido - 3-N	– morfolino propanesulfônico
<i>Nested</i> -PCR	– reação em cadeia da polimerase do tipo <i>Nested</i>
pb	– pares de bases
PBS	– solução tampão de salina fosfato (1,5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , azida, pH 7)

PBS-EDTA	– tampão de salina fosfato contendo 2 mM de ácido etilenodiamino
PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase
FDR	– <i>False discovery ratio</i>
RNA	– ácido ribonucleico
RNA _m	– ácido ribonucleico mensageiro
Rnase A	– ribonuclease A
RNA _{sin}	– inibidor de RNA
rNTP	– ácido ribonucleico ribossomal
RPMI	– meio de cultura do Roswell Park Memorial Institute
RT	– enzima Transcriptase Reversa
RTK	– receptor de tirosina quinase
TE	– 10mM Tris HCl, 1mM EDTA
TGF- β	– fator de crescimento transformante beta
T47D	– linhagem epitelial mamária derivada de infusão pleural de carcinoma ductal
TRITC	– Isotiocianato de Tetrametil Rodamina Cristalina
UV	– luz ultravioleta
Vim	– vimentina - filamento intermediário expresso em células de origem mesenquimal.

Lista de Figuras

Figura 01. Esquema da primeira etapa da amplificação do mRNA.....	34
Figura 02. Esquema da segunda etapa da amplificação do mRNA.....	34
Figura 03. Expressão do gene Beta-actina e CK 19 após reação com os oligonucleotídeos iniciadores externos nas amostras de 1 célula MDA-MB-231 diluída em 1×10^6 mononucleares (amostras 1 e 2), 10 células MDA-MB-231 diluídas em 1×10^6 mononucleares (amostras 3 e 4), 100 células MDA-MB-231 diluídas em 1×10^6 mononucleares (amostras 5 e 6), células mononucleares (amostras 7 e 8) e células MDA-MB-231 (amostra 9). CN é o controle negativo da reação (sem cDNA).	41
Figura 04. Expressão do gene CK 19 após reação com os oligonucleotídeos iniciadores internos nas amostras de 1 célula MDA-MB-231 diluída em 1×10^6 mononucleares (amostras 1 e 2), 10 células MDA-MB-231 diluídas em 1×10^6 mononucleares (amostras 3 e 4), 100 células MDA-MB-231 diluídas em 1×10^6 mononucleares (amostras 5 e 6), células mononucleares (amostras 7 e 8) e células MDA-MB-231 (amostra 9). CN é o controle negativo da reação (sem cDNA).	41
Figura 05. Expressão de CK19 após reação com os oligonucleotídeos iniciadores internos nas amostras de aspirado de medula óssea das pacientes com câncer de mama. Hb4a – linhagem epitelial de mama normal, MNC – células mononucleares de sangue periférico, HL60 – linhagem de célula de leucemia promielocítica, CN – controle negativo (reação sem amostra).	43
Figura 06. Expressão de Beta-actina após reação com os oligonucleotídeos iniciadores nas amostras de aspirado de medula óssea das pacientes com câncer de mama. Hb4a – linhagem epitelial de mama normal, MNC – células mononucleares de sangue periférico, HL60 – linhagem de células de leucemia promielocítica, CN – controle negativo (reação sem amostra).	43
Figura 07. Células estromais obtidas de cultura primária de medula óssea de pacientes com câncer de mama. (A) Células estromais pertencentes à primeira passagem durante a segunda semana de cultivo. (B) Células estromais pertencentes à primeira passagem durante a quinta semana de cultivo. Aumento 100x.....	45
Figura 08. Caracterização imunocitológica das células em cultura primária de medula óssea de pacientes com câncer de mama. (A) Expressão	

- citoplasmática de vimentina, (B) marcação nuclear com DAPI do mesmo campo de A, (C) ausência de expressão de pancitoqueratina e (D) marcação nuclear com DAPI para o mesmo campo de C. No inserto (A) presença de anticorpo secundário IgG conjugado a TRITC e (B) mesmo campo marcado com DAPI (200x).....47
- Figura 09. Em (A) podemos observar linfócitos obtidos de sangue periférico de doador sadio apresentando expressão de CD45, (B) nos mostra marcação nuclear com DAPI para o mesmo campo de A, (C) ausência de expressão de CD45 em células de cultura primária de medula óssea de pacientes com câncer de mama após a quarta passagem e (D) marcação nuclear com DAPI para o mesmo campo de C. (200x).48
- Figura 10. RNA total das amostras a serem amplificadas. Hb4a-célula referência, CEMNC -células estromais oriundas de medula não comprometida, CEMC -células estromais oriundas de medula comprometida.49
- Figura 11. Gel de agarose a 1% da obtido de corrida eletroforética representativo para as amostras de RNA amplificado das células estromais estudadas. Observa-se arrasto mais concentrado na região entre os fragmentos 350 a 750pb. CEM- amostra de célula estromal oriunda de medula óssea de paciente com câncer de mama.51
- Figura 12. Gel de agarose a 1% obtido de corrida eletroforética, representativo para o RNA amplificado da célula utilizada como referência, Hb4a. Em A observa-se o padrão de peso molecular (100pb); em B, C, D, E, temos representadas diferentes alíquotas desta linhagem. Todas utilizadas para a realização do *pool* de célula referência. O arrasto mais concentrado situa-se na região entre os fragmentos 350 a 750pb.51
- Figura 13. Imagem da hibridização da amostra de célula estromal oriunda de medula comprometida em lâmina de *cDNA microarray*. À esquerda temos a imagem que representa a amostra de célula estromal 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 das duas imagens previamente descritas. Foram realizados dois ensaios ambos com inversão dos corantes entre a amostra de célula estromal e a amostra da referência, ambos com resultados similares. Os sinais gerados pela hibridização competitiva das duas amostras foram capturados e quantificados em *scanner* a laser confocal com canal duplo (*ScanArray Express*).53
- Figura 14. Genes diferencialmente expressos em amostras de células estromais oriundas de medula óssea comprometida em relação

àquelas oriundas de medula não comprometida segundo análise MA *plot* do *HT Self-Self*. Estabeleceu-se a curva limite a partir da análise MA *plot* das amostras de células estromais oriundas de medula óssea não comprometida. Os genes hiperexpressos e hipoexpressos nas células estromais oriundas de medula comprometida em relação àquelas oriundas de medula não comprometida estão localizados acima do limite superior ou abaixo do limite inferior da curva..... 57

Figura 15. Diagrama do número de genes diferencialmente expressos em células estromais de medula comprometida em relação a células estromais de medula não comprometida. Em verde representação do número de genes com expressão similar em ambos os tipos de células estromais e, em rosa, o número de genes diferencialmente expressos..... 58

Figura 16. Agrupamento hierárquico não supervisionado baseado na expressão gênica das amostras de células estromais. A expressão diferencial está representada em uma matriz: cada linha representa um único gene, sendo a abundância média do seu transcrito representada pela cor da célula correspondente na matriz. A barra de cores representa a variação da expressão: vermelho indica uma maior expressão enquanto verde indica uma menor expressão; cinza equivale a dados não disponíveis. O dendograma (coluna) representa similaridades no padrão de expressão entre as amostras experimentais (uma amostra corada com Cy3 e uma com Cy5). As cores das linhas no topo e à esquerda representam a confiabilidade da reamostragem (*bootstrap*). Preta 100%, azul 90-80%, verde 80-70%, amarelo 70-60%, laranja 60-50%, rosa 50-0%. CEMC - célula estromal oriunda de medula óssea comprometida, CEMNC - célula estromal oriunda de medula óssea não comprometida. 61

Lista de Tabelas

Tabela 01. Dados sobre as pacientes com câncer de mama que foram recrutadas para este estudo	18
Tabela 02. Descrição dos oligonucleotídeo utilizados	29
Tabela 03. Detecção de micrometástases na medula óssea das pacientes com câncer de mama	43
Tabela 04. Características do grupo selecionado	44
Tabela 05. Descriminação das lâminas de <i>cDNA microarray</i> e da marcação das amostras utilizadas com os fluoróforos Cy3 e Cy5 para hibridização	52
Tabela 06. Genes diferencialmente expressos em fibroblastos derivados de medula comprometida em relação a fibroblastos derivados de medula não comprometida. Distribuição quanto à ontologia gênica (Processo biológico, função molecular ou componente celular - nível 6).....	60
Tabela 07. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos em células estromais oriundas de medula óssea comprometida em relação àquelas não comprometidas das pacientes com câncer de mama segundo análise pelo “Onto-Express”	77

Resumo

Milani C. *Expressão gênica diferencial das células estromais obtidas de medula óssea na presença ou ausência de célula tumoral oculta em pacientes com câncer de mama* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 87p.

A célula estromal pode influenciar o desenvolvimento do tumor no sítio primário e secundário, mas pouco é conhecido sobre as características moleculares das células estromais presentes na medula óssea de pacientes com câncer de mama. Nosso objetivo foi avaliar a expressão gênica diferencial entre as células estromais oriundas de medula óssea na presença ou ausência de célula tumoral oculta. Coletamos dez aspirados de medula óssea das pacientes com câncer de mama. A classificação do comprometimento da medula por células tumorais ocultas foi realizada pela detecção da expressão de CK19 por *Nested-RT-PCR* e quatro entre dez pacientes apresentaram presença de célula tumoral na medula óssea. Estabelecemos culturas primárias de células estromais de todas as amostras e, selecionamos amostras originárias de duas pacientes contendo linfonodos comprometidos e presença de célula tumoral oculta em medula e também de duas pacientes que não apresentavam linfonodos comprometidos e nem célula tumoral oculta na medula. As pacientes selecionadas eram pós-menopausadas com diagnóstico de carcinoma ductal invasor e expressão imunohistoquímica positiva para receptor de estrógeno e progesterona. Realizamos avaliação do perfil de expressão gênica entre estes dois grupos, o que nos revelou 21 genes diferencialmente expressos dentre os 4.608 genes imobilizados em lâmina de *cDNA microarray*; nove genes hiperexpressos em célula estromal de medula comprometida (*PTHLH*, *TLOC1*, *NCOA6*, *C17orf57*, *ANAPC11*, *MAST4*, *POLR3E*, *CPNE1* e *B4GALT5*) e doze genes hipoexpressos em célula estromal de medula comprometida (*MRPL2*, *NAT10*, *DAP*, *RNF2*, *FLOT2*, *FKBP10*, *SLIT3*, *EBNA1BP2*, *SLC35B2*, *MICAL2*, *GPR3*, *TSPAN17*). Nossos dados sugerem que apesar da expressão gênica de células estromais oriundas de medula óssea comprometida ou não por micrometástases ser semelhante, algumas diferenças podem ser identificadas.

Descritores: neoplasias mamárias, medula óssea, células estromais, queratina/análise, expressão gênica, análise de sequência com séries de oligonucleotídeos/métodos.

Summary

Milani C. *Differential gene expression of bone marrow stromal cells from breast cancer patients in the presence or absence of occult tumor cells* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 87p.

Stromal cells may influence tumor development in primary and secondary sites, however, molecular characteristics of bone marrow stromal cells from breast cancer patients are almost unknown. Our aim was to evaluate the differential gene expression of bone marrow stromal cells from breast cancer patients in the presence or absence of occult tumor cells. Bone marrow (BM) aspirates were obtained from 10 breast cancer patients. The presence of occult bone marrow disseminated tumor cells was detected by CK19 expression quantified by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Presence of tumoral cell was detected in four of ten BM samples. Stromal cells primary cultures were established and samples from two patients with positive lymph nodes and presence of occult tumor cells in bone marrow and samples from two patients with negative lymph nodes and absence of occult tumor cells in bone marrow were selected. All the included patients were postmenopausal with invasive ductal carcinoma and positive estrogen and progesterone receptors detected by immunohistochemical analysis. Gene profile evaluated in *cDNA microarray* slides containing 4.608 spotted genes revealed 21 differentially expressed genes, nine upregulated (*PTHLH*, *TLOC1*, *NCOA6*, *C17orf57*, *ANAPC11*, *MAST4*, *POLR3E*, *CPNE1* e *B4GALT5*) and twelve downregulated (*MRPL2*, *NAT10*, *DAP*, *RNF2*, *FLOT2*, *FKBP10*, *SLIT3*, *EBNA1BP2*, *SLC35B2*, *MICAL2*, *GPR3*, *TSPAN17*) in stromal cell derived from bone marrow in the presence of tumor breast cancer cell. Our data suggest that gene expression from bone marrow derived stromal cells in the presence or absence of occult tumor cells seems similar, however small differences may be identified.

Keywords: Breast neoplasms, bone marrow, stromal cells, keratin/analysis, gene expression, oligonucleotide array sequence analysis/methods

1. Introdução

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e no Brasil. O Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde estima que em 2006 ocorrerão 48.930 casos novos de câncer de mama em mulheres no Brasil. Estima-se ainda que, no Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 71 casos novos por 100 mil, sem considerar os tumores de pele não melanoma. Por estas razões este constitui um problema de saúde pública (INCA, 2006).

A carcinogênese é caracterizada por um processo de múltiplos passos, no qual uma série de alterações genéticas e epigenéticas ocorre em seqüência, levando as células a perderem seu controle da proliferação, diferenciação, apoptose e reparo do DNA (Volgestein et al., 1993).

O potencial para uma célula alterada originar um tumor depende da interação entre fatores que promovem o crescimento tumoral, sobrevivência, angiogênese, invasão e metástase (Fidler, 2003). Sendo assim, a metástase é um processo de múltiplos passos que começa com a aquisição de um fenótipo móvel e invasor pelas células do tumor primário. A penetração dos capilares sanguíneos e linfáticos locais é seguida pela adesão e extravasamento dos vasos, permitindo infiltração em outros órgãos e tecidos e proliferação em sítios secundários específicos (Sloan & Anderson, 2002; Chambers et al., 2002; Zhu et al., 2005).

A alta mortalidade associada ao câncer de mama pode ser atribuída principalmente à disseminação regional ou à distância (Mundy, 2002; Pantel & Brakenhoff, 2004). Na ausência de metástase à distância que ocorre principalmente em ossos, fígado, pulmões e sistema nervoso central, o comprometimento linfonodal é tido como fator prognóstico mais importante relacionado à recidiva precoce e sobrevida (AJCC, Cancer staging handbook – 6ª edição) (Weigelt et al., 2005). O esqueleto é o sítio mais comum de metástase à distância (ou sistêmica) em pacientes com câncer de mama, e ainda, estes pacientes poderão desenvolver metástase na medula óssea em algum período durante a evolução de sua doença (Mundy, 2002; Gilbey et al., 2004).

Embora o comprometimento dos linfonodos seja o fator prognóstico mais importante, cerca de 20 a 30% das pacientes com câncer de mama sem comprometimento de linfonodos apresenta recidiva da doença (Funke et al., 1998, Weinschenker et al., 2004, Braun et al., 2000, 2005; Weigelt et al., 2005). Alguns estudos sugerem que o comprometimento dos linfonodos não prediz a disseminação hematogênica das células tumorais (Pantel & Brakenhoff, 2004; Braun et al., 2005; Braun & Naume, 2005).

Outro fator que pode estar relacionado à evolução da doença é a presença de células metastáticas isoladas na medula óssea, pois a detecção de células tumorais por imunocitoquímica dentro da medula óssea tem surgido como um marcador independente para recidiva e sobrevida em pacientes com câncer de mama (Braun et al., 2000; Pantel & Brakenhoff, 2004; Gilbey et al., 2004).

Pantel et al. (2003) revelaram que células tumorais disseminadas estavam presentes em 20 a 40% das pacientes com câncer de mama primário sem qualquer sinal clínico ou histopatológico de metástase. Braun et al. (2005) e Schoenfeld et al. (1997) demonstraram que a persistência de células metastáticas ocultas na medula óssea após o tratamento prediz o aumento do risco para recorrência da doença (Braun, 2004). Braun et al. (2000) estudaram 552 pacientes com câncer de mama num seguimento mediano de 38 meses e sugeriram que a presença de células metastáticas na medula óssea, comparada com a sua ausência, apresentou-se como um fator prognóstico independente do comprometimento linfonodal.

Além disso, Wiedswang et al. (2003) relataram que a presença de células epiteliais tumorais isoladas da medula óssea de pacientes com câncer de mama conferiu uma chance de recidiva sistêmica significativamente maior (31,7%) em relação a sua ausência (13,7%) na medula óssea. Em uma continuação deste estudo Wiedswang et al. (2004) coletaram nova amostra de medula óssea somente do grupo de pacientes sem recidiva da doença três anos após o diagnóstico inicial. Dentre aquelas em que se detectou células malignas isoladas em medula óssea, 21% desenvolveu a doença após seguimento mediano de 25 meses contra 7% em que a medula óssea mostrou-se livre de células tumorais, chegando a uma conclusão semelhante ao primeiro trabalho.

Em 2005, Braun et al. numa meta-análise avaliaram dados individuais de pacientes oriundos de 9 estudos em relação à presença de micrometástases na medula óssea das pacientes com câncer de mama.

Foram incluídas 4.703 pacientes com carcinoma mamário em estadiamento clínico I, II e III. O período de seguimento foi de 10 anos (mediana de 5,2), detectando-se micrometástases em 30,6% das pacientes. A presença de micrometástases correlacionou-se significativamente com sobrevida global e com menor sobrevida livre de doença.

Por outro lado, Mansi et al. (1999), após um seguimento longo de 12 anos, descreveu que apesar da presença de micrometástases medulares estar associada com uma menor sobrevida global e sobrevida livre de doença, este não poderia ser considerado como um fator prognóstico independente.

Uma maneira de identificar células metastáticas disseminadas é pela detecção de citoqueratinas e todos estes trabalhos previamente citados realizaram esta detecção por imunocitoquímica. Diversas metodologias foram desenvolvidas ao longo dos anos para detecção de citoqueratinas, filamentos intermediários característicos de células epiteliais e que estão presentes nas células epiteliais mamárias, como CK 8, 18 e 19 (Ronnov-Jessen et al., 1996; Woelfle et al., 2004), entretanto, uma outra maneira de determinar a presença de micrometástases é por RT-PCR, este último ensaio sensível e, suficientemente específico, capaz de detectar uma célula metastática em um milhão de células normais (Slade et al., 1999; Berois et al., 2000; Pantel & Brakenhoff, 2004; Gilbey et al, 2004).

Benoy et al (2004) compararam a imunocitoquímica com RT-PCR quantitativa para identificar células disseminadas através da expressão de CK19 e encontraram correlação ($p < 0,0001$) entre as duas técnicas em

aspirado de medula óssea. Para tanto, estes padronizaram um limite para considerar a reação de RT-PCR como positiva para CK19. Ismail et al (2004) detectaram por RT-PCR elevados níveis de CK19 em medula óssea e sangue periférico de pacientes com câncer de mama comparados aos controles, isto é, amostras de pacientes com doença benigna da mama ou doenças hematológicas ($p < 0.001$), entretanto, não houve correlação significativa entre expressão positiva de CK19 positiva na medula óssea e os outros fatores prognósticos clássicos. Igualmente, Berois et al., (2000) detectaram presença de célula epitelial tumoral em medula óssea por RT-PCR para o transcrito de CK19 e CEA, encontrando presença dos mesmos em 48% e 29% das pacientes, respectivamente, sem, no entanto, correlacioná-las separadamente a nenhum outro fator prognóstico clássico. No entanto, quando estes foram analisados em conjunto, foi observada uma correlação positiva com comprometimento linfonodal.

Benoy et al. (2006) também determinaram a presença de célula epitelial tumoral na medula óssea pela expressão de citoqueratina por RT-PCR. Estes autores estabeleceram uma expressão limite para CK19 baseada na expressão deste gene em indivíduos de um grupo controle com doença hematológica ou doença benigna da mama, e então, estudaram a presença de CK19 em sangue periférico e medula óssea de pacientes com câncer de mama. Estes relataram que uma expressão positiva de CK19 na medula óssea, mas não no sangue periférico, confere um pior prognóstico às pacientes, mas não observaram relação entre expressão do marcador epitelial e os fatores prognósticos clássicos.

Deste modo, a presença de células epiteliais em medula óssea mostrou-se, em alguns trabalhos, mas não em outros, correlacionar-se com pior sobrevida ou sobrevida livre de doença (Funke et al., 1998; Braun et al., 2000; Hayes et al., 2003; Piccart et al., 2003; Goldhirsch et al., 2003). Desta forma, sua análise poderá ser uma importante ferramenta para o seguimento de pacientes com câncer de mama no futuro (Braun, 2004).

A propensão de diversos tipos de câncer a formar focos metastáticos em órgãos específicos é parcialmente explicada pela hipótese “A semente e o solo” na qual a 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).

É possível que características específicas presentes no tumor primário possam estar norteando o local em que as células tumorais irão se alojar. Entretanto, o estroma também pode estar influenciando esta característica.

Em concordância com a primeira hipótese, Woelfle et al. (2003) encontraram diferentes perfis de expressão gênica no tumor primário de pacientes com câncer de mama com presença ou não de células tumorais metastáticas na medula óssea. As pacientes foram classificadas de acordo com a expressão imunocitológica de citoqueratina na medula óssea, caracterizando comprometimento ou não por célula tumoral oculta. Oitenta e seis genes apresentaram expressão diferencial significativa entre os dois grupos. No total, nove destes genes estavam hiperexpressos e setenta e sete hipoexpressos em tumores primários de pacientes com câncer de mama,

sugerindo que a repressão transcricional dos genes parece ser importante para o processo de micrometástase. Os genes diferencialmente expressos no tumor foram aqueles relacionados com o remodelamento da matriz extracelular (osteonectina, laminina), adesão (caderina 11), citoesqueleto (CK 8,10,18,19) e transdução de sinal (IGF-BP3, STAT1, CXCR6), particularmente as vias de RAS e de hipóxia induzida por fator 1 alfa (HIF-1 α).

Além disso, características destas células micrometastáticas indicam que estas representam um grupo seleto de uma população heterogênea de células dormentes que podem alcançar a medula óssea precocemente durante o desenvolvimento do câncer de mama (Braun & Pantel, 1999). Este estado pode ser intrínseco deste tipo celular, entretanto, também pode ser influenciado pelo ambiente no qual estas células estão inseridas (Nicola et al., 2003), já que estas podem permanecer quiescentes, sem perder a viabilidade por longos períodos de tempo, e vir a proliferar, anos após o diagnóstico inicial da doença. Pantel et al. (1993) avaliaram a proliferação destas células micrometastáticas através da expressão de Ki67 e observaram positividade em 15,9% delas. Já Ross et al. (1993) mostraram que células circulantes isoladas da medula óssea apresentaram um crescimento clonal *in vitro*.

A medula óssea com o seu papel de suporte da proliferação, renovação e maturação das células progenitoras hematopoiéticas, parece ser um nicho apropriado para adesão, modulação e crescimento de células disseminadas micrometastáticas (Lee et al., 2004). Esta propriedade distinta do microambiente medular está provavelmente relacionado com a

competência das células estromais de produzirem uma combinação de citocinas, fatores de crescimento, moléculas da matriz extracelular e pela sua habilidade de estabelecer contatos heterotípicos entre as células (Hombauer et al., 2000; Balduino et al., 2005). Entre a complexidade celular da medula óssea existe um subgrupo de células não hematopoiéticas referidas como células estromais, capazes de se renovar, proliferar e diferenciar. Estas propriedades conferem às células estromais a capacidade de serem precursores de ossos, cartilagem e tecido conectivo e muscular (Pittenger et al., 1999; Seshi et al., 2003; Kim et al., 2005). Diversos grupos têm demonstrado que estas podem ser prontamente isoladas por aderência ao plástico e expandida diversas vezes (Wynn et al, 2004).

Fukino et al. (2004) relataram que interações dinâmicas entre o epitélio e o estroma em tumores sólidos podem selecionar subgrupos de células estromais com a capacidade de modular o comportamento tumoral. Dentro deste contexto é possível dizer que está se tornando proeminente a importância da contribuição do fibroblasto como principal componente do ambiente estromal como agente *modificador* sobre a progressão do câncer (Olumi et al., 1999; Bhowmick et al., 2004; Orimo et al., 2005).

Uma maneira de estudar as interações funcionais entre células epiteliais e fibroblastos diz respeito a co-culturas, modelo no qual ambas as células são cultivadas em concomitância. 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 o de células mamárias imortalizadas e que fibroblastos obtidos de tecido mamário

canceroso não influenciam a proliferação destas duas linhagens epiteliais mamárias. Por outro lado, Shekhar et al. (2001) mostraram que fibroblastos normais derivados de mamoplastia inibem o crescimento de linhagens epiteliais mamárias normais, enquanto fibroblastos provenientes de câncer de mama induzem o seu crescimento. De acordo com este segundo relato, Lefebvre et al. (1995), demonstraram uma maior proliferação de linhagens de câncer de mama co-cultivadas com fibroblastos originários de câncer de mama, mas o mesmo não ocorreu com células epiteliais mamárias normais. Nestes trabalhos, pequenas diferenças relativas ao modo de co-cultura podem ter originado estas diferenças. Enquanto Dong-Le Bourhis et al. (1997) cultivaram os fibroblastos e as células epiteliais separados por membrana, 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. Utilizando um outro modelo de co-cultura, 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. Portanto, 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.

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 de

carcinoma 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 estudos animais, Camps et al. (1990) sugerem que a presença de fibroblastos é importante para o desenvolvimento do tumor ao mostrar que fibroblastos de próstata de rato, NbF-1, inoculados com células epiteliais, entre elas células de câncer de mama humano MDA-MB-436, em camundongos imunossuprimidos, levam à formação de tumores, o que não acontece quando as células epiteliais são injetadas isoladamente. Em concordância, Krtolica et al. (2001) demonstraram que a injeção concomitante de células epiteliais malignas e fibroblastos senescentes em camundongos levaram à formação de tumores. Este fato pode ser atribuído à ação parácrina de fatores de crescimento secretados pelos fibroblastos.

Uma das vias que pode estar envolvida é a de TGF- β , como evidenciado por Bhowmick et al (2004) cujos dados mostraram que a sinalização de TGF- β em fibroblastos afeta diferencialmente o crescimento epitelial e a oncogênese do epitélio adjacente através de um modelo de camundongo transgênico condicionalmente inativo para *Tgfb β 2*. Este expressa o receptor de TGF- β RII de maneira célula-específica após o oitavo dia do desenvolvimento embrionário. Assim, a perda da sinalização de TGF em fibroblastos estromais foi acompanhada por hiperplasia epitelial o que pode ser resultado da supressão de inibidores de cdk (p27 e p21), bem como a indução de c-myc nas células epiteliais adjacentes.

Em outro estudo Kuperwasser et al (2004) mostraram que fibroblastos influenciam a formação das estruturas da glândula mamária, bem como a carcinogênese mamária. Para tanto, estes utilizaram camundongos NOD/SCID imunocomprometidos (*nonobese diabetic/severe combined immunodeficient*) e implantaram fibroblastos transformados que hiperexpressam fatores de crescimento como TGF- β ou HGF e células epiteliais mamárias oriundas de mamoplastia, o que levou à formação do carcinoma mamário.

Ainda em modelo xenogênico, Orimo et al. (2005) co-injetaram células tumorais MCF-7 transfectadas com RAS com fibroblastos normais ou fibroblastos carcinoma-associados e observaram um crescimento tumoral aumentado na última situação. Assim, temos que o ambiente estromal mamário alterado pode promover o desenvolvimento do câncer de mama

O estabelecimento e desenvolvimento de micrometástases na medula óssea é menos conhecido, poucos trabalhos analisaram a interação entre o estroma e célula epitelial de câncer de mama. Segundo Brooks et al. (1997) células tumorais mamárias, mas não células epiteliais normais, aderiram de modo preferencial ao estroma derivado de medula óssea se comparado àquele derivado de tecido mamário. Neste estudo, o estroma medular conferiu uma maior adesão, contudo não pareceu propício para proliferação. Fierro et al. (2004) co-cultivaram células MCF-7 sobre células estromais obtidas de medula óssea e observaram que o crescimento da célula epitelial dá-se de forma isolada, oposto a proliferação de forma coesiva e agrupada que estas células desenvolvem em substrato plástico, talvez associada à perda de expressão de E-caderina. Já Korah et al. (2004) demonstraram que

a sobrevivência de células tumorais mamárias bem diferenciadas, MCF-7 e T47-D, no ambiente medular é mediada por fibronectina.

Aparentemente, tanto fatores inerentes às células malignas quanto fatores secretados por células estromais e encontrados na matriz, bem como a interação física entre estas células, pode influenciar a manutenção de células tumorais isoladas na medula óssea.

Portanto, nosso objetivo foi avaliar a expressão gênica diferencial entre as células estromais de medula óssea comprometida e não comprometida por células tumorais metastáticas em pacientes com carcinoma mamário.

2. Objetivos específicos

1. Determinar a presença de células epiteliais tumorais disseminadas em medula óssea de pacientes com câncer de mama pela expressão de citoqueratina 19 por reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase do tipo *Nested* (RT-PCR).
 2. Estabelecer cultura primária de células estromais de medula óssea comprometida ou não por células tumorais disseminadas, e caracterizá-la por imunocitoquímica com anticorpos contra vimentina, pan-citoqueratina e antígeno leucocitário.
 3. Avaliar a expressão gênica de células estromais oriundas de medula óssea comprometida ou não comprometida por células epiteliais tumorais disseminadas, utilizando-se lâmina de *cDNA microarray* contendo 4.608 genes.
-

3. Métodos

3.1 Casuística

Neste estudo foram recrutadas de modo prospectivo dez pacientes com diagnóstico histopatológico de carcinoma invasivo de câncer de mama com estadiamento clínico (EC) I, II e III, não submetidas ao tratamento neoadjuvante no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006 no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) pela Dra. Ana Paula Santana de Abreu, mastologista do IBCC. Suas características encontram-se na tabela 1. A idade mediana das pacientes foi de 60 (38 a 80), a idade mediana da menarca foi de 13 (11 a 15), sendo que todas elas encontravam-se na pós-menopausa ao diagnóstico sendo ainda a idade mediana da menopausa de 42 anos (36 a 50). Segundo o estadiamento clínico (classificação patológica), 9 pacientes encontram-se no EC II (90%), 1 no EC III (10%) (AJCC, 2002). O tipo histológico predominante foi carcinoma ductal infiltrante (90% dos casos), sendo apenas um carcinoma lobular.

Tabela 01. Dados sobre as pacientes com câncer de mama que foram recrutadas para este estudo

<i>Amostra</i>	<i>Idade</i>	<i>Estadiamento Clínico</i>	<i>Tipo histológico</i>	<i>Comprometimento de linfonodos</i>	<i>Receptor de estrógeno</i>	<i>Receptor de progesterona</i>
CEMC 1	63	II	CDI	-	-	-
CEMC 2	76	III	CDI	+	+	+
CEMC 3	80	II	CLI	-	ND	ND
CEMNC 4	54	II	CDI	-	+	+
CEMNC 5	56	II	CDI	+	+	+
CEMC 6	57	II	CDI	+	+	+
CEMNC 7	69	II	CDI	-	+	+
CEMNC 8	41	II	CDI	+	+	+
CEMNC 9	38	II	CDI	+	+	-
CEMNC10	64	II	CDI	+	ND	ND

Amostra: (CEMNC) Célula estromal oriunda de medula não comprometida, (CEMC) Célula estromal oriunda de medula comprometida. Tipo histológico: CDI-carcinoma ductal invasor, CLI-carcinoma lobular invasor; Comprometimento de linfonodos: (-) negativo, (+) positivo; Receptor de Estrógeno e de Progesterona: (-) ausência, (+) presença, (ND) não determinado; Micrometástases na medula óssea: (-) ausência, (+) presença.

Este trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do IBCC e à Comissão de Ética para Análise de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) sob o protocolo de nº102/05, sendo aprovado em ambas instituições. Todas as pacientes, após serem informadas sobre a pesquisa, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O modelo do formulário está anexado no final do trabalho. Coletou-se de cada paciente, 10 ml de aspirado de medula óssea no segundo espaço intercostal do osso esterno durante o ato cirúrgico.

3.2 Transporte das Amostras

As pacientes foram submetidas à punção aspirativa de medula óssea de esterno durante o ato cirúrgico, estando a paciente sob anestesia geral. Realizamos uma pequena incisão na pele (cerca de 0,5 cm) da região a ser puncionada, após prévia assepsia, a fim de minimizar a contaminação do material com células epiteliais da pele, sendo coletados 10 ml. O transporte foi realizado num tubo contendo 10 ml de meio de cultura Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco, Nova Iorque, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco, Nova Iorque, EUA) e contendo ampicilina (concentração final 100 µg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil), estreptomicina (concentração final 100 µg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil), fungizona (concentração final 2,5 µg/ml) e heparina (20 UI/ml) (Cristália, São Paulo) a 4°C.

3.3 Medula Óssea

A medula óssea foi processada no mesmo dia, logo após a sua chegada ao laboratório para a separação da camada de mononucleares.

3.3.1 Obtenção da camada de mononucleares para cultura primária de células estromais

Para obtenção das células estromais de medula óssea utilizamos um método de gradiente de centrifugação pelo reagente Ficoll-PaqueTM Plus (d=1,077g/ml) (Amersham Biosciences, Inglaterra). Homogeneizou-se bem a amostra, adicionou-se 20 ml de solução tampão de salina fosfato (PBS) gelado e homogeneizou-se novamente. Uma alíquota de 9 ml da amostra foi retirada para separação de MNC para realização da PCR. Em outro tubo cônico colocou-se 3 ml de Ficoll-PaqueTM Plus (Amersham Biosciences, Inglaterra) a temperatura ambiente e, cuidadosamente, adicionou-se a amostra de medula diluída sem que houvesse mistura das fases. A proporção de 3ml de Ficoll para 10ml de amostra sempre foi mantida. Centrifugou-se a 200 x g por 30 minutos a temperatura ambiente. Logo após, removeu-se a camada de mononucleares, segunda camada da parte superior para a inferior, muito cautelosamente, e adicionou-se PBS de maneira a se obter 3 vezes o volume capturado dos mononucleares. Misturou-se delicadamente com pipeta Pasteur e centrifugou-se a 80 x g por 6 minutos, repetindo esse procedimento e então centrifugando-se a 35 x g por 10 minutos. Ressuspendeu-se em 20 ml de meio de cultivo para medula óssea e plaqueou-se em garrafas de 75 cm² (Nalgene Inc, EUA).

3.3.2 Condições de cultivo das células estromais

A cultura primária de células estromais foi cultivada em meio de cultura Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco, Nova Iorque, EUA), contendo ampicilina (concentração final 100 µg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil), estreptomicina (concentração final 100 µg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil) e fungizona (concentração final 2,5 µg/ml) e suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco, Nova Iorque, EUA). As células foram mantidas em uma incubadora de umidade controlada a 37°C em atmosfera constante de 5% de CO₂.

Durante as primeiras quatro semanas de cultivo, somente 50% do volume do meio de cultura foi trocado por semana. Após este intervalo, suficiente para que as células estromais, aderentes, atingissem confluência, as mesmas foram tripsinizadas e subcultivadas em garrafas de área maior, passando a ser suplementadas com 10% de soro fetal bovino. Esta foi denominada como segunda passagem celular. As células de origem hematopoiéticas foram sendo eliminadas a cada troca de meio e tripsinização, visto que as mesmas não são aderentes, isto é, permanecem livres no sobrenadante (Ulloa-Montoya et al., 2005). Consideramos que a cada tripsinização havia o aumento de uma passagem celular. Para os ensaios utilizamos células estromais entre as passagens 4 e 10. Todo o procedimento foi realizado em um fluxo laminar da Veco (Veco do Brasil Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda, Unicamp, Brasil). Após o estabelecimento de uma cultura homogênea de células estromais, a partir da quarta passagem, iniciamos a montagem de um banco de congelamento

para estas células. A contagem das células foi realizada e um total de 1×10^6 células eram congeladas usando-se a seguinte solução para cada ampola de 1 mL: 95% de soro fetal bovino e 5% de DMSO (Dimetil-sulfóxido, SIGMA –ALDRICH Corporation, Saint Louis, EUA). Estas foram estocadas por 24 horas em sistema para congelamento Nalgene™ Cryo (Nalgene Inc, EUA) em freezer a -70°C e depois transferidas para um container de nitrogênio líquido, onde permaneceram até o uso.

3.3.3 Cultura de célula epitelial mamária

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, Nova Iorque, EUA), suplementado com 10 % de soro fetal bovino, inativado por calor (Gibco, Nova Iorque, EUA), 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina bovina (SIGMA –ALDRICH Corporation, Saint Louis, EUA), 5 $\mu\text{g/ml}$ de hidrocortisona (SIGMA –ALDRICH Corporation, Saint Louis, EUA).

3.3.4 Caracterização imunocitoquímica da cultura primária de células estromais

O ensaio de imunocitoquímica foi realizado para comprovar se as células estromais cultivadas estavam livres de contaminação por outros tipos celulares.

Inicialmente foram plaqueadas 1×10^5 de células estromais em uma placa de 24 poços com 2 cm^2 de área (Nunc, Dinamarca), contendo lamínulas de vidro circulares com $0,13 \text{ cm}^2$ de área (Kittel Gläser, Alemanha). Após 24h, quando as células aderidas às lamínulas apresentavam confluência, o meio de cultura foi retirado e as lamínulas lavadas com PBS. A etapa seguinte foi de fixação e permeabilização da membrana celular com acetona por 5 minutos. Em seguida as mesmas foram lavadas com solução tampão PBS-BSA 0,2% por 3 vezes, por um período de 10 minutos e então com PBS-BSA 2% por 30 minutos.

Posteriormente, foi efetuada a titulação e incubação por 1 hora a temperatura ambiente com os seguintes anticorpos primários gerados em camundongo: (1) anticorpo monoclonal anti-citoqueratina humana (CK 5, 6, 8, 17 e 19), clones AE1/AE3 (1:50) (Dako Corporation, Carpinteria, EUA); (2); anticorpo monoclonal anti-vimentina humana, clone Vim 3b4 (1:100) (Dako Corporation, Carpinteria, EUA) e (3) anticorpo anti-CD-45, clone 2B11/PD7/26 (1:500) (Dako Corporation, Carpinteria, EUA). Utilizamos 150µl de cada anticorpo diluído. Após a remoção dos anticorpos primários e de 3 lavagens seriadas com PBS-BSA 0,2%, Foi realizada a incubação por 1 hora

a temperatura ambiente com um segundo anticorpo gerado em cabra contra IgG de camundongo conjugado a TRITC (Isotiocianato de Tetrametil Rodamina Cristalina), clone T7782 (1:100) (SIGMA –ALDRICH Corporation, Saint Louis, EUA). Após esta incubação, o anticorpo secundário foi então removido através de 3 lavagens de 10 minutos com solução de PBS-BSA 0,2%. Para visualização nuclear, utilizamos o corante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) na diluição 1:500 em PBS . Seguiu-se uma incubação de 5 minutos, e 3 lavagens de 10 minutos com solução tampão PBS-BSA 0,2%. Para a montagem das lamínulas sobre as lâminas de vidro utilizamos uma gota de glicerol. Estas mesmas foram analisadas em microscópio de fluorescência NIKON Eclipse E600 (Japão) e as imagens capturadas e digitalizadas pelo programa Eclipse Net versão 1.16.3.

3.3.5 Obtenção de camada de mononucleares para Reação em Cadeia da Polimerase

Colocou-se o material da medula coletado num tubo, diluindo uma vez com salina de tampão fosfato (PBS) gelado e homogeneizou-se. Em outro tubo cônico colocou-se 3 ml de Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Inglaterra) a temperatura ambiente e, cuidadosamente, adicionou-se a amostra de medula diluída sem que houvesse mistura das fases. A proporção de 3ml de Ficoll para 10ml de amostra foi sempre mantida. Centrifugou-se a 200 x g por 30 minutos a temperatura ambiente. Logo após, removeu-se a camada de mononucleares, segunda camada da parte superior para a inferior,

muito cautelosamente, e adicionou-se PBS de maneira a se obter 3 vezes o volume capturado dos mononucleares. Misturou-se delicadamente com pipeta Pasteur e centrifugou-se a 200 x g por 15 minutos, repetindo esse procedimento. Ressuspendeu-se em 1ml de PBS num tubo de 1,5 ml, retirou-se o sobrenadante e, finalmente adicionou-se 1000µl de TRIzol[®] (Invitrogen, EUA), homogeneizando esta viscosa solução e guardando-a no freezer-70°C para extração do RNA total das células.

3.4 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído pelo reagente TRIzol[®] (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina) (Invitrogen, EUA), que é uma modificação do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987). Esperou-se o descongelamento da amostra e aguardou-se 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200µl de clorofórmio (NUCLEAR, São Paulo, Brasil), homogeneizou-se por inversão, aguardando 3 minutos a temperatura ambiente, e centrifugou-se a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Este procedimento foi baseado na habilidade do RNA permanecer solúvel na fase constituída por fenol e clorofórmio na presença de isotiocianato de guanidina. Retirou-se o sobrenadante constituído pela fase aquosa adicionando-o a 500µl de álcool isopropílico (NUCLEAR, São Paulo, Brasil) num tubo novo. Homogeneizou-se e incubou-se no freezer -20°C por 12 horas para fase de precipitação. Posteriormente, centrifugou-se a 12.000 x g

por 10 minutos a 4°C, desprezou-se o sobrenadante, adicionando-se 1 ml de etanol a 75% para lavagem, misturando bem, e centrifugando a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Secou-se o precipitado, ressuspensando-o em 10µl de água deionizada tratada com dietilpircarbonato (DEPC) que constitui um forte inibidor de ribonucleases e incubou-se por 10 minutos a 65°C para permitir completa dissolução do RNA. A concentração das amostras foi determinada por espectrofotometria (medida da absorbância a 260 e 280 nm) e a integridade do RNA confirmada em gel de agarose a 1%.

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

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 4µg de RNA total diluídos em 10µl de água DEPC e ao qual foram acrescentados 2µl de oligonucleotídeos hexâmeros iniciadores (0,5 µg/µl) (Amersham Biosciences, Inglaterra). A mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos para romper qualquer estrutura secundária que pudesse ter sido formada e, posteriormente colocada imediatamente no gelo por 2 minutos. Adicionou-se 4µl de tampão da *SuperScript III* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) (Invitrogen, EUA), 2µl de mistura de nucleotídios (dNTPs) a 2,5 mM, 1µl de ditioneitol (DTT) a 0,1M (Invitrogen, EUA) que age na denaturação da cadeia molde. Incubou-se por 10 minutos a 55°C e colocou-se 1µl da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (200U/µl)

(Invitrogen, EUA), incubando-se por 60 minutos. Ao final elevou-se a temperatura a 70°C por 15 minutos, estocando a -20°C até o uso.

3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação de cDNA

Neste caso, foi realizada uma reação denominada *Nested-PCR*. Nesta reação há uma primeira rodada de PCR na qual se utilizam oligonucleotídeos externos que flanqueiam uma grande região dentro da seqüência alvo a fim de originar um produto de maior tamanho e, em seguida, uma segunda que utiliza o produto desta primeira associado aos oligonucleotídeo internos os quais amplificarão um fragmento menor dentro interna da seqüência alvo. As duas rodadas de amplificação promovem o aumento da sensibilidade e também contribuem para um acréscimo da especificidade visto que os dois conjuntos de oligonucleotídeo utilizados são alvos-específicos, pois foram desenhados em diferentes éxons a fim de se evitar contaminação com DNA genômico, minimizando a possibilidade de obtenção de produtos inespecíficos.

Todos os oligonucleotídeo iniciadores descritos (Tabela 2) foram desenhados a partir da seqüência de mRNA do gene em questão contidos no site (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide). A escolha da região para confecção do oligonucleotídeo foi baseada na presença de grandes introns entre os éxons de interesse contidos no DNA do gene. Deste modo, diminui-

se a chance de reação cruzada com o DNA genômico, pois a DNA polimerase não sintetiza fragmentos de grande tamanho. A seguir, copiou-se a sequência do mRNA e colocou-se no programa *Primer 3* (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

A verificação da similaridade constituiu um passo seguinte muito importante, pois verificou a presença da sequência do oligonucleotídeo iniciador em relação a diversas seqüências depositadas no *site NCBI* (www.ncbi.nlm.nih.gov/) a fim de se verificar se a utilização do mesmo iria amplificar só a região de interesse ou outras inespecíficas no genoma humano que poderiam intervir no resultado.

Para a primeira reação de PCR, utilizou-se 2µl do cDNA obtido anteriormente (aproximadamente 1 a 2µg), ao qual foi adicionado a 18µl de uma mistura contendo 2µl de tampão 10x (200mM Tris-HCl pH 8.4; 500mM KCl), 2µl de dNTPs (200nM), 0,6µl de cloreto de magnésio (50 mM) (Invitrogen, EUA), 2µl de tampão da Taq Polimerase (Invitrogen, EUA), 0,3µl da enzima *Recombinant Taq DNA Polymerase* (5U/µl) (Invitrogen, EUA), 10,1µl de água deionizada, 1µl do oligonucleotídeo direto (2µM) e do reverso do gene em estudo. Foram efetuados 35 ciclos para primeira roda de amplificação, enquanto a segunda rodada de amplificação foi de 30 ciclos conforme determinado adiante. Como controle interno da reação, utilizamos um gene constitutivamente expresso, a beta-actina (β -actina) (35 ciclos). O nosso propósito foi o de detectar a possível presença de células epiteliais tumorais circulantes através de um gene marcador de célula epitelial, a citoqueratina 19 (CK 19).

Tabela 02. Descrição dos oligonucleotídeo utilizados

β-actina	direto	5´-AGAAAATCTGGCACCACACC -3´	
	indireto	5´-AGAGGCGTACAGGGATAGCA -3´	
CK 19	Externo	direto	5´-CACTACTACACGACCATCCAGGAC -3´
		indireto	5´-CAAATTGTTGTAGTGATCTTCCTG -3´
	Interno	direto	5´-TTTGAGACGGAACAGGCTCT-3´
		indireto	5´-TCTTCCAAGGCAGCTTTCAT -3´

Todos os oligonucleotídeo foram sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville).

As condições para a reação externa foram de 95°C por 5 minutos, 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 72°C por 10 minutos. E para a reação interna, a temperatura de anelamento foi a mesma também por 1 minuto. Foram realizados 35 ciclos de amplificação na primeira rodada de PCR e 30 ciclos na segunda. As reações ocorreram em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Califórnia, Estados Unidos).

O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose a 2% com brometo de etídio e com um padrão marcador de DNA para 100 pares de bases (pb). O tamanho dos produtos obtidos com os oligonucleotídeos interno e externo para citoqueratina são de, respectivamente, 798 e 461 pb.

Linhagens celulares utilizadas: nas reações de PCR, utilizamos linhagens celulares para a padronização.

- HB4a – Célula epitelial luminal mamária de origem humana obtida de mamoplastia e imortalizada pela transfecção do vírus SV40 que expressa citoqueratina 18 e 19 (Harris et al., 1995; 1999);
- MDA-MB-231 – Linhagem de câncer de mama derivada de efusão pleural de paciente com câncer de mama metastático. Esta linhagem expressa receptores do fator de crescimento epidermal (EGF) e do fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) e não expressa receptores de estrógeno. Esta linhagem é tumorigênica e origina metástases se injetada em animais (Número de catálogo ATCC = HTB-26);
- HL60 – Linhagem celular humana de leucemia pró-mielocítica aguda obtida de leucaférese. Esta linhagem é positiva para expressão de myc, apresenta diferenciação espontânea e causa tumor em camundongos imunodeprimidos. (Número de catálogo ATCC= CCL-240).

3.7 Amplificação do mRNA

Como a quantidade de RNA total recuperado das amostras isoladas é insuficiente para realização dos experimentos de *microarray*, foi sendo realizada amplificação do RNA das células a serem estudadas. O protocolo de amplificação de mRNA baseia-se em Wang et al (2000) e foram realizadas modificações visando um melhor resultado (Figura 2 e 3).

Também faz-se necessário utilizar-se uma amostra que será tida como referência com fins metodológicos, neste caso utilizamos uma linhagem epitelial luminal mamária, a Hb4a. Parte-se de 4 µg de RNA total do material que se deseja amplificar, diluído em 6 µl de H₂O DEPC contendo 1 µl (0,5 µg/µl) do iniciador oligo dT (15)-T7 (5' AAA CGA CGG GCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC 3'). O RNA total é desnaturado a 70°C por 10 minutos e o anelamento do oligonucleotídeo ocorre enquanto a reação atinge a temperatura ambiente. O promotor do fago bacteriano T7 presente no oligo dT é incorporado na síntese de cDNA pela reação de transcrição reversa (RT) por adição de 4 µl tampão 5x da *SuperScript III* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) (Invitrogen, EUA), 2 µl dithiotreitol (DTT) a 0,1 M (Invitrogen, EUA), 2 µl dNTP 10 mM, 1 µl RNasin (Promega Corporation, WI, EUA), 2 µl (0,5 µg/µl) TS (*template switch*) oligonucleotídeo (5' AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG 3') e 2 µl da enzima *Superscript III reverse transcriptase* (Invitrogen, EUA). Realiza-se uma incubação a 25°C por 10 minutos, seguida pela síntese do cDNA propriamente dito por 2 horas a 42°C, e então ocorre uma desnaturação a 70°C por 15 minutos.

A segunda fita de DNA é sintetizada por adição, na reação anterior, de 106 µl de H₂O DEPC, 15 µl de tampão *Advantage PCR* (40 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 5,0 mM β-mercaptoetanol, 25 mM (NH₄)₂SO₄, 50% Glicerol) (Clontech Laboratories, CA, EUA), 3 µl dNTP 10 mM (Amersham Biosciences, Inglaterra), 1 µl *RNase-H* (Promega Corporation, WI, EUA) e 3 µl da enzima *Advantage cDNA Polymerase* (Clontech Laboratories, CA, EUA). Dividiu-se então, após cuidadosa

homogeneização, a amostra em dois tubos contendo 75µl em cada. No termociclador os seguintes ciclos de temperatura foram utilizados: 37°C por 5 minutos para digestão do RNAm, 94°C por 3 minutos para desnaturação do cDNA, 65°C por 3 minutos para anelamento específico do oligonucleotídeo TS e 75°C por 30 minutos para a extensão final. As reações são paralisadas por incubação a 65°C por 10 minutos em 7,5 µl de NaOH 1 M com 2 mM EDTA para que ocorra a desnaturação da enzima. O cDNA dupla fita é purificado por adição de 150 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), inversão por 2 minutos e centrifugação a 14000 x g por 5 minutos. A fase aquosa é transferida para um novo tubo de 1,5 ml, acrescenta-se 500 µl de etanol absoluto gelado (Merk Corporation, EUA), 70 µl de acetato de sódio a 3 M pH 5.2 para ocorrer a precipitação do cDNA. Centrifuga-se a 14000 x g por 20 minutos em temperatura ambiente, e então é feito um protocolo de lavagem por 3 vezes com etanol 70% com água DEPC, realizando-se centrifugações a 14000 rpm por 2 min. Por fim, realiza-se a secagem do cDNA e ressuspendendo-o em 20 µl de água DEPEC.

Para a reação de transcrição *in vitro* utiliza-se o kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems-SP6, T3, T7 (Promega Corporation, WI, EUA). Adiciona-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 é incubada por 6 horas a 37°C. O RNA amplificado (aRNA) é purificado e o cDNA dupla fita removido pelo método de TRIzol® (Invitrogen, EUA). A concentração é determinada por leitura da absorbância a 260 e 280 nm (GeneQuant, Clamart Cedex, França).

Para a segunda etapa de amplificação de mRNA, partiu-se de 1 a 5µg do aRNA (RNA amplificado) anterior em 7 µl de volume. Quando necessário, as amostras foram concentradas em *Speed Vac* (Sped Vac Concentrator, Savant). Adiciona-se 1 µl (2µg/µl) de oligonucleotídeo hexâmero randômico (pdN₆) (Amersham Biosciences, Inglaterra). A síntese de cDNA é realizada adicionando-se 5 µl do tampão 5x da *SuperScript III* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) (Invitrogen, EUA), 2 µl dithiotreitol 0,1 M (Invitrogen, EUA), 2 µl dNTP 10 mM, 1 µl RNasin (Promega Corporation, WI, EUA). A reação é incubada por 10 minutos a 65°C e seguida do acréscimo de 2 µl *Superscript III transcriptase reversa* (Invitrogen, EUA). Essa reação é incubada por 2 horas a 42°C ao final desta incubação, adicionou-se 1 µl de RNase H que agiu por 20 minutos a 37°C. Para a síntese da segunda fita de cDNA utiliza-se o iniciador oligo dT (15)-T7 com o sítio promotor do fago bacteriano T7, adicionando-o a reação descrita acima e com 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.

Figura 01. Esquema da primeira etapa da amplificação do mRNA

Figura 02. Esquema da segunda etapa da amplificação do mRNA

3.8 Hibridização em lâminas de vidro

As hibridizações das lâminas de *cDNA microarray* foram realizadas no laboratório de Expressão Gênica do Instituto de Pesquisa sobre o Câncer, sob a coordenação da Dra. Dirce Maria Carraro.

As lâminas de *cDNA microarray* utilizadas foram construídas no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e denominadas 4.8K02_03. Estas foram imobilizadas com 4.800 seqüências, 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 seqüências completas (*full length*); ii) Clone com tamanho maior que 300 pares de bases com seqüência de alta qualidade (conteúdo de CG); iii) Clone que quando pesquisado no site: <http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast> resultou em gene com identidade > que 85% em 100 pb; e iv) Clone com seqüência mais 3'. As lâminas de *cDNA microarray* foram pré-hibridizadas a 42°C durante vinte 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 (verde) e cy5 (vermelho) (*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. Quatro microgramas 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, Amersham Biosciences, Inglaterra) para abertura de possíveis estruturas secundárias sendo, em seguida, resfriado em gelo por 2 minutos. Os RNAm foram transcritos reversamente à primeira fita de cDNA na presença de 400U da enzima transcriptase-reversa (*SuperScript III*, Invitrogen, EUA), 500µM de cada desoxinucleotídeo dATP, dGTP e dCTP e 100µM de dTTP, 1mM DTT, 1X de tampão de transcrição reversa (Invitrogen, EUA), 40U de inibidor de Rnase (Rnasin, Promega Corporation, WI, EUA) e 3 mM de Cy-3 dUTP ou Cy-5 dUTP em uma reação com volume final de 50µL. A reação de síntese de cDNA foi então incubada a 42°C por 2 horas sendo a hidrólise do RNA feita pela adição de 1,5µL de EDTA 0,5M e 1,5µL de NaOH 0,1M, seguida de incubação a 70°C durante 20 minutos, esta reação foi neutralizada pela adição de 1,5µL de HCl 1M.

Os nucleotídeos não incorporados foram removidos através de uma etapa de purificação em microcoluna Autoseq G50 (Amersham Biosciences, Inglaterra). A sonda de cDNA foi então dissolvida em 47,5µL de tampão de hibridização (10X SSC, 0,2%SDS) e 23,75µL de formamida deionizada (SIGMA-ALDRICH Corporation, Saint Louis, EUA). 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, aplicou-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 100 x g, para posterior leitura e análise dos resultados.

3.9 Leitura dos dados e Análise Estatística

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluorocromos Cy3 e Cy5 quando excitados pela luz emitida pelo sistema foram capturados num *scanner* confocal (Arraypress, Packard Boiscience). A luz emitida pelos fluorocromos excitados é convertida em elétrons pelas fotomultiplicadoras com uma voltagem idêntica para todas as lâminas, sendo os dados avaliados por um software (Packard Bioscience).

Realizamos então a leitura da intensidade de cada ponto de hibridização separadamente para cada um dos dois fluorocromos utilizados

e então foi realizada a subtração do ruído (*background*), sendo eliminados os pontos de hibridização que atingiram a saturação e a intensidade do sinal superou o limite de detecção. A normalização do sinal foi realizada pela energia total da lâmina, isto é, assumindo que a intensidade total de todos os elementos do *array* deve ser a mesma para cada amostra hibridizada. Realizamos réplica técnica das análises, isto é, cada uma das amostras foi primeiramente marcada com um dos dois fluorocromos e então hibridizada em concomitância a células HB4A marcadas com o fluorocromo inverso. A seguir, outra reação de hibridização foi efetuada, utilizando o mesmo material, mas agora com inversão dos corantes usados para a marcação, originando duas leituras para uma determinada amostra. Comparamos, então, a energia total do sinal correspondente a uma sequência específica, levando em conta a mesma amostra marcada com cada um dos fluorocromos (Cy3 ou Cy5), e aqueles pontos onde não houve correspondência foram eliminados das análises.

A análise estatística foi realizada no Laboratório de Bioinformática do Hospital do Câncer sob a supervisão da Dra. Helena Brentani (São Paulo, Brasil). O Método HT *Self-Self* foi utilizado para determinar os genes diferencialmente expressos das amostras derivadas de medula com micrometástases em relação a amostras derivadas de medula normal. Este método de análise desenvolvido pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo está disponível no endereço eletrônico <http://blasto.iq.usp.br/~rvencio/HTself>. Uma análise hierárquica de agrupamento foi realizada baseando-se na distância Euclidiana de acordo com os genes diferencialmente expressos.

4. Resultados

4.1 Padronização da técnica de *Nested-PCR* para a detecção da expressão de citoqueratina 19 (CK 19) em linhagens celulares diluídas em células mononucleares de sangue periférico

Para estabelecer as melhores condições de detecção da expressão do gene da citoqueratina 19 (CK 19) no método de *Nested-PCR* utilizamos uma linhagem de câncer de mama, a MDA-MB-231. Esta célula é derivada de efusão pleural de paciente com câncer de mama metastático e expressa o gene em questão (Cailleau et al., 1974; Ronnov-Jessen et al, 1996). Para a primeira reação na qual se utilizam os oligonucleotídeos externos e também os oligonucleotídeos para o gene da beta-actina realizamos 35 ciclos de amplificação, enquanto para a segunda amplificação realizada somente com o par de oligonucleotídeos internos do gene da citoqueratina 19 foram realizados 30 ciclos.

Para determinar a sensibilidade da *Nested-PCR* em detectar células tumorais circulantes que atingiram a medula óssea das pacientes com câncer de mama, realizamos a pesquisa do gene da citoqueratina 19. Para tanto realizamos *Nested-PCR* de diluições de células MDA-MB-231 em células mononucleares obtidas de sangue periférico de doadora sadia sem câncer. As diluições simularam a presença de 1 célula tumoral em 1×10^6 mononucleares, 10 células tumorais em 1×10^6 mononucleares e 100 células

células tumorais em 1×10^6 mononucleares. Assim sendo, na primeira reação de amplificação com os oligonucleotídeos externos não foi detectada a expressão de CK19 em qualquer uma das diluições (Figura 03), enquanto na segunda reação de amplificação com os oligonucleotídeos internos o transcrito foi observado desde a primeira diluição (Figura 04).

Figura 03. Expressão do gene Beta-actina e CK 19 após reação com os oligonucleotídeos iniciadores externos nas amostras de 1 célula MDA-MB-231 diluída em 1×10^6 mononucleares (amostras 1 e 2), 10 células MDA-MB-231 diluídas em 1×10^6 mononucleares (amostras 3 e 4), 100 células MDA-MB-231 diluídas em 1×10^6 mononucleares (amostras 5 e 6), células mononucleares (amostras 7 e 8) e células MDA-MB-231 (amostra 9). CN é o controle negativo da reação (sem cDNA).

Figura 04. Expressão do gene CK 19 após reação com os oligonucleotídeos iniciadores internos nas amostras de 1 célula MDA-MB-231 diluída em 1×10^6 mononucleares (amostras 1 e 2), 10 células MDA-MB-231 diluídas em 1×10^6 mononucleares (amostras 3 e 4), 100 células MDA-MB-231 diluídas em 1×10^6 mononucleares (amostras 5 e 6), células mononucleares (amostras 7 e 8) e células MDA-MB-231 (amostra 9). CN é o controle negativo da reação (sem cDNA).

4.2 Presença de células metastáticas ocultas na medula óssea de pacientes com tumores de mama (CK19).

Foi detectada a presença de células metastáticas ocultas na medula óssea de 4 pacientes (40%) pela expressão de citoqueratina 19 através do método de PCR do tipo *Nested*.

Podemos observar na figura 5 que não houve expressão de CK19 na célula HL60 (célula de leucemia promielocítica) a qual foi utilizada como controle negativo da expressão de CK 19, como também não foi observada expressão deste transcrito quando não se adicionou amostra de cDNA à reação. Em contrapartida a célula Hb4a (célula epitelial mamária) apresentou expressão do marcador epitelial. Após execução desta reação fomos capazes de separar as pacientes em dois grupos distintos um em que temos presença, e noutro, no qual temos a ausência de célula tumoral oculta na medula óssea das pacientes com câncer de mama recrutadas para este estudo.

Figura 05. Expressão de CK19 após reação com os oligonucleotídeos iniciadores internos nas amostras de aspirado de medula óssea das pacientes com câncer de mama. Hb4a – linhagem epitelial de mama normal, MNC – células mononucleares de sangue periférico, HL60 – linhagem de célula de leucemia promielocítica, CN – controle negativo (reação sem amostra).

Figura 06. Expressão de Beta-actina após reação com os oligonucleotídeos iniciadores nas amostras de aspirado de medula óssea das pacientes com câncer de mama. Hb4a – linhagem epitelial de mama normal, MNC – células mononucleares de sangue periférico, HL60 – linhagem de células de leucemia promielocítica, CN – controle negativo (reação sem amostra).

Tabela 03. Detecção de micrometástases na medula óssea das pacientes com câncer de mama

<i>Pacientes</i>	<i>Micrometástases em medula óssea.</i>
CEM 1	+
CEM 2	+
CEM 3	+
CEM 4	-
CEM 5	-
CEM 6	+
CEM 7	-
CEM 8	-
CEM 9	-
CEM 10	-

Micrometástases na medula óssea: (-) ausência, (+) presença

Selecionamos amostras de pacientes com carcinoma ductal invasor, expressão positiva de receptores hormonais e agrupamos de acordo com a presença de linfonodos e medula comprometida ou pelo não comprometimento linfodonal e medular (Tabela 04).

Tabela 04. Características do grupo selecionado

	<i>Amostra</i>	<i>Idade</i>	<i>Estadiamento Clínico</i>	<i>Tipo histológico</i>	<i>Linfonodos</i>	<i>RE</i>	<i>RP</i>	<i>Micrometástases na medula óssea</i>
<i>Células estromais oriundas de medula não comprometida (CEMNC)</i>	CEMNC4	54	II	CDI	-	+	+	-
	CEMNC7	69	II	CDI	-	+	+	-
<i>Células estromais oriundas de medula comprometida (CEMC)</i>	CEMC2	76	III	CDI	+	+	+	+
	CEMC6	57	II	CDI	+	+	+	+

Tipo histológico: CDI-carcinoma ductal invasor, CLI-carcinoma lobular invasor; Receptor de estrógeno (RE): (-) ausência, (+) presença; Receptor de progesterona (RP): (-) ausência, (+) presença; Linfonodos: (-) não comprometidos, (+) comprometidos; Micrometástases na medula óssea: (-) ausência, (+) presença.

4.3 Obtenção de cultura primária de células estromais

Foram estabelecidas as culturas primárias de células estromais obtidas de medula óssea de pacientes com câncer mama. Observou-se uma pequena quantidade destas células após 2 semanas de cultivo (Figura 7A). Ao se completar 4 a 5 semanas de cultivo (Figura 7B), as células estromais atingiram a confluência ocupando praticamente toda a superfície da garrafa, e então realizou-se a primeira tripsinização. Após o estabelecimento de cultura homogênea de células, expandimos a mesma para realização dos ensaios e também com o propósito de congelá-las.

Figura 07. Células estromais obtidas de cultura primária de medula óssea de pacientes com câncer de mama. (A) Células estromais pertencentes à primeira passagem durante a segunda semana de cultivo. (B) Células estromais pertencentes à primeira passagem durante a quinta semana de cultivo. Aumento 100x.

4.4 Caracterização imunocitoquímica da cultura primária de células estromais

Após o estabelecimento de uma cultura homogênea de células estromais, isto é, após a quarta passagem, procedemos com a caracterização desta população celular através de ensaios de imunocitoquímica utilizando anticorpos monoclonais contra vimentina, molécula característica do citoesqueleto de células de origem mesenquimal, citoqueratinas (pan-citoqueratina: 5, 6, 8, 17 e 19), moléculas características do citoesqueleto de células epiteliais e CD45, um antígeno leucocitário de membrana característico de células hematopoiéticas (incluindo macrófagos) (Seshi et al.,2000).

O resultado das reações de imunocitoquímica nos confirmou a homogeneidade desta cultura primária e as células apresentaram positividade para expressão de vimentina, sem marcação positiva utilizando anticorpos contra os filamentos de citoqueratina e de CD45, apontando para origem mesenquimal (Figura 08).

Figura 08. Caracterização imunocitológica das células em cultura primária de medula óssea de pacientes com câncer de mama. (A) Expressão citoplasmática de vimentina, (B) marcação nuclear com DAPI do mesmo campo de A, (C) ausência de expressão de pan-citoqueratina e (D) marcação nuclear com DAPI para o mesmo campo de C. No inserto (A) presença de anticorpo secundário IgG conjugado a TRITC e (B) mesmo campo marcado com DAPI (200x).

Figura 09. Em (A) podemos observar linfócitos obtidos de sangue periférico de doador sadio apresentando expressão de CD45, (B) nos mostra marcação nuclear com DAPI para o mesmo campo de A, (C) ausência de expressão de CD45 em células de cultura primária de medula óssea de pacientes com câncer de mama após a quarta passagem e (D) marcação nuclear com DAPI para o mesmo campo de C. (200x).

4.5 Obtenção do RNA amplificado

Partimos de 4µg de RNA total (Figura 10) das amostras de fibroblastos oriundos de medula óssea comprometida ou não por células tumorais e também da linhagem de célula epitelial luminal mamária tida como referência, a Hb4a, para realizar a amplificação do RNA.

Figura 10. RNA total das amostras a serem amplificadas. Hb4a-célula referência, CEMNC -células estromais oriundas de medula não comprometida, CEMC -células estromais oriundas de medula comprometida.

Amplificamos diversas alíquotas da célula referência Hb4a (Figura 12) e o produto da amplificação de todas as alíquotas foram unidos para que fosse possível realizar a hibridização de todas as lâminas de *cDNA microarray* com a mesma amostra referência, eliminando-se o fator viés de utilização de diferentes alíquotas como referência.

A avaliação da qualidade das amostras de RNA amplificado foi realizada em eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 0,5g µg de RNA amplificado juntamente com 5µl de tampão (TAE1x, uréia 7M, loading buffer 3x), sendo a amostra desnaturada a 70° por 10 minutos, e a seguir adicionando 2µl brometo de etídio a 0,5µg/µl. O tampão de corrida foi TAE 0,5x e a voltagem utilizada 55mV.

Como podemos observar na figura 11, o aRNA obtido foi de boa qualidade visto que a maior concentração de moléculas encontra-se situada entre 350 e 750 pb.

Figura 11. Gel de agarose a 1% da obtido de corrida eletroforética representativo para as amostras de RNA amplificado das células estromais estudadas. Observa-se arrasto mais concentrado na região entre os fragmentos 350 a 750pb. CEM-amostra de célula estromal oriunda de medula óssea de paciente com câncer de mama.

Figura 12. Gel de agarose a 1% obtido de corrida eletroforética, representativo para o RNA amplificado da célula utilizada como referência, Hb4a. Em A observa-se o padrão de peso molecular (100pb); em B, C, D, E, temos representadas diferentes alíquotas desta linhagem. Todas utilizadas para a realização do *pool* de célula referência. O arrasto mais concentrado situa-se na região entre os fragmentos 350 a 750pb.

4.6 Hibridização

As sondas de cDNA de fibroblastos marcadas com os fluoróforos (Tabela 5) foram aplicadas nas lâminas de *cDNA microarray* contidas na estação de hibridização e em seguida lavadas para remoção do material não incorporado.

A réplica técnica ou inversão de corantes para marcação da mesma amostra foi utilizada para identificar variações que pudessem ocorrer durante a marcação da amostra com o fluorocromo, isto é, caso um cDNA apresentasse marcação preferencial com o fluorocromo verde ou vermelho. Como estamos fazendo comparações entre amostras idênticas, espera-se que as medidas obtidas sejam consistentes, ou seja, sem variações. Assim, foram realizadas duas hibridizações para cada amostra. Na primeira lâmina, a controle, a sonda foi corada com o Cy3 e a amostra referência com Cy5, na segunda lâmina foi efetuada a troca de corantes para marcação (*swap*), a sonda foi corada com o Cy5 e a amostra referência com Cy3 (Figura 13) de modo a evitar um erro experimental pela diferença de incorporação dos fluoróforos.

Tabela 05. Descriminação das lâminas de *cDNA microarray* e da marcação das amostras utilizadas com os fluoróforos Cy3 e Cy5 para hibridização

Lâminas	13207705	13207710	13227267	13227270	13207548	13207558	13207712	13227250
Amostras	CEMNC4	CEMNC4	CEMNC7	CEMNC7	CEMC2	CEMC2	CEMC6	CEMC6
	Cy3-dUTP	Cy5-dUTP	Cy3-dUTP	Cy5-dUTP	Cy3-dUTP	Cy5-dUTP	Cy3-dUTP	Cy5-dUTP
	Hb4a	Hb4a	Hb4a	Hb4a	Hb4a	Hb4a	Hb4a	Hb4a
	Cy5-dUTP	Cy3-dUTP	Cy5-dUTP	Cy3-dUTP	Cy5-dUTP	Cy3-dUTP	Cy5-dUTP	Cy3-dUTP

Referência: célula Hb4a, Amostras: CEMNC – célula estromal de oriunda de medula não comprometida, CEMC- célula estromal oriunda de medula comprometida com célula tumoral.

Figura 13. Imagem da hibridização da amostra de célula estromal oriunda de medula comprometida em lâmina de *cDNA microarray*. À esquerda temos a imagem que representa a amostra de célula estromal 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 das duas imagens previamente descritas. Foram realizados dois ensaios ambos com inversão dos corantes entre a amostra de célula estromal e a amostra da referência, ambos com resultados similares. Os sinais gerados pela hibridização competitiva das duas amostras foram capturados e quantificados em *scanner* a laser confocal com canal duplo (*ScanArray Express*).

As lâminas de *cDNA microarray* utilizadas foram construídas no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e denominadas 4.8K02_03. A plataforma contém 4.800 seqüências imobilizadas e está dividida em 48 quadrantes, cada um contendo 100 pontos, sendo que 4.608 representam diferentes genes humanos e os 192 pontos restantes são controles positivos e negativos da hibridização. Dos 4.608 genes representados, 2.159 genes têm função conhecida e estão divididos em 505 classes funcionais segundo as anotações do *Gene Ontology*. Dos genes com função conhecida, os de maior representação estão envolvidos em regulação da transcrição (12,51%), crescimento e/ou manutenção celular (3,47%), sinais de transdução (2,83%), adesão celular (2,83%) e desenvolvimento (2,65%). Os pontos tidos como controle negativo são aqueles em que não há nenhum fragmento fixado. Os pontos controle positivos são aqueles em que há o cDNA do fago utilizado para a clonagem dos fragmentos da lâmina devidamente marcado com a intensidade dos corantes Cy3 e Cy5.

Captura das Imagens

Os sinais fluorescentes gerados pela hibridização das amostras (seqüências de cDNA marcadas com Cy3 dCTP e Cy dCTP que se ligaram às seqüências imobilizadas na lâmina) foram capturados em sistema de análise a *laser* de fluorescência. O sistema conta com dois *lasers* com comprimentos de onda diferentes, que estimulam especificamente o fluorocromo Cy3 ou o Cy5. As moléculas marcadas com o Cy3 (canal 1) são primeiramente excitadas pelo *laser* e o comprimento de onda é detectado

pelo *scanner*. A seguir o mesmo procedimento é realizado para *escaneamento* de marcação com fluorocromo Cy5 (canal 2). Para a quantificação desses sinais o *scanner* faz a conversão da luz emitida pelos fluoróforos excitados em energia elétrica, produzindo um sinal mensurável, sendo a intensidade dos sinais fluorescentes proporcional à expressão gênica. A leitura dos fluoróforos é feita separadamente e a composição da imagem é realizada pelo programa. A amplificação do sinal pelas células fotomultiplicadoras foi de 50% em todas as amostras.

Quantificação do Sinal

Os dados foram adquiridos e quantificados pelo programa *ScanArray* (Perkin Elmer Life Sciences, Inc., EUA). Este programa permite a localização automática dos pontos de cDNA hibridizados na lâmina baseando-se em marcadores de posição. O programa realizou o cálculo de intensidade de cada ponto de hibridização para cada uma das amostras, gerando o arquivo csv.

Análise dos Dados

Para determinação dos genes diferencialmente expressos utilizamos método *HT Self-Self*, que permite análise de ensaios de *cDNA microarray* contendo pequeno número de amostras. Este método é composto de dois passos: a determinação das curvas de limites (*cutoff*) do *Self-Self* e a aplicação dessas curvas aos dados de interesse previamente normalizados.

Para a determinação da curva de limite, analisamos primeiramente as hibridizações da réplica técnica das duas amostras de medula óssea

normais isoladamente, em que cada amostra foi marcada por Cy3 e Cy5 e hibridizada em lâmina de *cDNA microarray* contendo os genes a serem avaliados. A expressão de cada gene deu origem a um ponto em um gráfico *MA plot* em que a razão da expressão do gene (M) varia de acordo com a intensidade do seu sinal (A) utilizando-se os dados das amostras de medula não contendo célula tumoral, no qual $M = \log_2(\text{Cy3} / \text{Cy5})$ e $A = (\log_2(\text{Cy3}) + \log_2(\text{Cy5})) / 2$ para cada gene. Após a determinação destes valores para as duas amostras não tumorais individualmente, analisou-se a relação entre as mesmas pelo método *HT Self-Self* para determinação da curva limite propriamente dita. Assim, a partir da dispersão ou distribuição dos valores obtidos no *MA plot* foi possível determinar o intervalo de confiabilidade para a curva limite. Essa análise foi realizada através do método *Kernel Density Estimator*, em que não se assume a distribuição normal dos pontos no *MA plot*, das amostras (consideradas não comprometidas) que serão a base da comparação e considera-se a hipótese nula (H_0) na qual não há diferença na expressão entre os genes resultantes da hibridização e considera-se um limite de 99%, isto é, inclua 99% dos resultados.

A curva limite determinada a partir das amostras normais estabelece um intervalo no qual não são considerados como diferencialmente expressos aqueles genes que se encontram dentro dela. A seguir, um procedimento semelhante foi aplicado para análise das amostras de medula comprometida e, para tanto, calculou-se o gráfico do tipo *MA plot* para cada amostra oriunda de medula contendo célula tumoral (T1 e T2) em relação a cada amostra de medula não contendo célula tumoral (NT1 e NT2) pelo cálculo de $M = \log_2(\text{média}(T_n) / \text{média}(NT_n))$ e $A = [\log_2(\text{média}(T_n)) + \log_2(\text{média}(NT_n))] / 2$.

Posteriormente, realizou-se a sobreposição destes valores MA *plot* obtidos em cada uma das quatro relações obtidas e os limites de 99%, obtidos no self-self para as amostras normais foram sobrepostos ao self-self das amostras tumorais com as normais. Dessa forma os valores acima e abaixo dos limites supracitados destacam-se como genes candidatos à expressão diferencialmente significativa (Figura 14).

Figura 14. Genes diferencialmente expressos em amostras de células estromais oriundas de medula óssea comprometida em relação àquelas oriundas de medula não comprometida segundo análise MA *plot* do *HT Self-Self*. Estabeleceu-se a curva limite a partir da análise MA *plot* das amostras de células estromais oriundas de medula óssea não comprometida. Os genes hiperexpressos e hipoexpressos nas células estromais oriundas de medula comprometida em relação àquelas oriundas de medula não comprometida estão localizados acima do limite superior ou abaixo do limite inferior da curva.

4.7 Perfil da expressão gênica diferencial entre células estromais oriundas de medula óssea comprometida por micrometástases em relação às células estromais oriundas de medula óssea não comprometida

Vinte e um genes foram diferencialmente expressos em células estromais de medula óssea comprometida em relação à não comprometida obtidas de pacientes com câncer de mama (Figura 15).

Figura 15. Diagrama do número de genes diferencialmente expressos em células estromais de medula comprometida em relação a células estromais de medula não comprometida. Em verde representação do número de genes com expressão similar em ambos os tipos de células estromais e, em rosa, o número de genes diferencialmente expressos.

Nove e doze genes foram, respectivamente, hiperexpressos e hipoexpressos em células estromais de medula óssea comprometida, e a relação da expressão variou de 1,38 a 7,20 vezes. A análise por

agrupamento hierárquico não supervisionado, utilizando a expressão diferencial destes genes (Figura 16) permitiu a classificação correta dos grupos: células estromais de medula óssea não comprometida e células estromais de medula óssea comprometida.

Para elucidar as vias biológicas, possivelmente alteradas, nas células estromais oriundas de medula comprometida em relação à medula não comprometida, nós realizamos dois tipos de análises. Numa delas classificamos tais genes segundo sua classificação ontológica (GO) para processos biológicos, nível 6 (“FatiGO”) (Tabela 6) o qual utiliza o total de genes do genoma como referência e não utiliza um modelo estatístico, mas calcula a porcentagem em respeito a todos os genes anotados com termos GO ou todos os genes conhecidos num organismo. Entre os genes diferencialmente expressos observamos funções relacionadas a processos metabólicos, regulação da transcrição e transporte de membrana. Alguns genes não possuem anotação ontológica nas três categorias funcionais (GO desconhecido).

Tabela 06. Genes diferencialmente expressos em fibroblastos derivados de medula comprometida em relação a fibroblastos derivados de medula não comprometida. Distribuição quanto à ontologia gênica (Processo biológico, função molecular ou componente celular - nível 6)

<i>Classificação Ontológica</i>	<i>Genes Hiperexpressos</i>	<i>Genes Hipoexpressos</i>
Ciclo celular	<i>ANAPC11</i>	
Metabolismo de carboidratos	<i>B4GALT5</i>	
Metabolismo de proteínas celulares	<i>MAST4</i>	<i>MRPL2</i> <i>FKBP10</i>
Proteína de membrana do retículo endoplasmático	<i>TLOC1</i>	
Proteína relacionada à síntese de ribossomos		<i>EBNA1BP</i>
Proteína relacionada com o desenvolvimento epidermal		<i>FLOT2</i>
Regulação da cascata de NF- Kappa B		<i>SLC35B2</i>
Regulação da proliferação celular	<i>PTHLH</i>	
Regulação da transcrição	<i>POLR3E</i> <i>NCOA6</i>	<i>RNF2</i>
Transporte de elétrons		<i>MICAL2</i>
Transporte de membrana	<i>CPNE1</i>	
Vias de sinalização ligadas à proteína G		<i>GPR3</i>
GO desconhecido	<i>C17orf57</i>	<i>NAT10, SLIT3</i> <i>DAP, TSPAN17</i>

Figura 16. Agrupamento hierárquico não supervisionado baseado na expressão gênica das amostras de células estromais. A expressão diferencial está representada em uma matriz: cada linha representa um único gene, sendo a abundância média do seu transcrito representada pela cor da célula correspondente na matriz. A barra de cores representa a variação da expressão: vermelho indica uma maior expressão enquanto verde indica uma menor expressão; cinza equivale a dados não disponíveis. O dendograma (coluna) representa similaridades no padrão de expressão entre as amostras experimentais (uma amostra corada com Cy3 e uma com Cy5). As cores das linhas no topo e à esquerda representam a confiabilidade da reamostragem (*bootstrap*). Preta 100%, azul 90-80%, verde 80-70%, amarelo 70-60%, laranja 60-50%, rosa 50-0%. CEMC - célula estromal oriunda de medula óssea comprometida, CEMNC - célula estromal oriunda de medula óssea não comprometida.

Outro método (“Onto-Express”) considera a análise ontológica num modelo numérico estatístico cuja idéia fundamental é atribuir um nível de significância às várias categorias funcionais pela comparação do número de genes diferencialmente expressos observados numa categoria funcional específica com o número de genes que podem aparecer na mesma categoria, isto é, genes imobilizados na lâmina que pertencem a esta determinada categoria (Khatri & Drăghici, 2005). Assim, esta análise nos permitiu observar que os genes diferencialmente expressos estavam envolvidos no metabolismo de macromoléculas (carboidratos, proteínas), histogênese (desenvolvimento epidermal), apoptose, transporte de moléculas, regulação da transcrição e comunicação celular (transdução de sinais) (Tabela 7, anexos). Esta análise foi realizada através do site <http://vortex.cs.wayne.wayne.edu>.

5. Discussão

É possível que a presença de células tumorais isoladas na medula óssea das pacientes com câncer de mama possa estar relacionada com um pior prognóstico da doença (Cristofanilli et al., 2004). Em nosso estudo, determinamos a presença de células epiteliais ocultas em medula óssea através da detecção da expressão de CK19 por *Nested* RT-PCR. Dentre dez pacientes, quatro apresentaram comprometimento de medula óssea por células tumorais, dados estes semelhantes a de outros autores que relataram detecção positiva em 30-40% dos pacientes sem metástase à distância (Weinschenker et al., 2004; Braun et al., 2005; Funke et al., 1998).

A detecção da expressão de CK19 tem sido bastante utilizada para detectar célula epitelial em medula óssea e sangue periférico, pois esta é expressa em grande parte dos carcinomas, mas não em células de medula óssea e sangue periférico de indivíduos saudáveis. Smirnov et al. (2005) analisaram o perfil de expressão gênico das células tumorais circulantes de três tipos de câncer e mostraram expressão positiva de CK19 em pacientes com câncer de mama, cólon e próstata. Por outro lado, Braun et al (2000) analisaram 191 e 552 pacientes sem e com câncer de mama, respectivamente, detectando células citoqueratina positivas em apenas 1% das pacientes controle. Ismail et al (2004) detectaram por RT-PCR elevados níveis de CK19 em medula óssea e sangue periférico de pacientes com

câncer de mama comparados aos controles ($p < 0.001$). Em concordância, trabalho prévio de nosso grupo não detectou presença de células epiteliais em sangue periférico de indivíduos saudáveis, utilizando a determinação de CK por *Nested* - RT-PCR.

Estudos genéticos e de biologia celular indicam que o crescimento tumoral não é somente determinado pelas células malignas propriamente ditas, mas também pelo estroma tumoral (Kalluri et al., 2006). Fibroblastos ativados no sítio metastático promovem a proliferação de células tumorais. Dentro deste contexto temos a importância da contribuição do fibroblasto como principal componente do ambiente estromal como agente *modificador* sobre a progressão do câncer (Olumi et al., 1999; Bhowmick et al., 2004; Orimo et al., 2005).

Estudos prévios do nosso grupo analisaram a expressão gênica de fibroblastos de pacientes com câncer de mama oriundos do sítio primário ou linfonodo regional. Entre fibroblastos originários de câncer de mama e tecido normal adjacente a doença benigna da mama observaram-se 47 genes diferencialmente expressos. Entre fibroblastos oriundos de linfonodos comprometidos e não comprometidos de pacientes com câncer de mama, 13 genes foram diferencialmente expressos.

Pouco é conhecido sobre as características moleculares das células estromais presentes na medula óssea de pacientes com câncer de mama. Mais obscuro ainda é se a presença de células tumorais metastáticas na medula óssea confere mudança no perfil de expressão das células estromais presentes neste ambiente medular ou se um perfil específico das células

estromais confere um aumento da suscetibilidade à presença das células micrometastáticas. Sendo assim, estabelecemos cultura primária de células estromais da medula óssea de pacientes com câncer de mama e as classificamos segundo o comprometimento da medula óssea ou não por células tumorais mamárias com o intuito de avaliar se há diferença de expressão gênica entre esta célula nestas duas situações.

As células estromais obtidas de medula óssea de pacientes com câncer de mama, seja ela comprometida ou não por células epiteliais tumorais, são células que guardam características semelhantes, pois dentre os 4.608 genes representados, encontramos somente 21 genes diferencialmente expressos entre eles. Nove genes hiperexpressos (*PTHLH*, *TLOC1*, *NCOA6*, *C17orf57*, *ANAPC11*, *MAST4*, *POLR3E*, *CPNE1* e *B4GALT5*) e doze genes hipoexpressos em células estromais de medula óssea comprometida (*MRPL2*, *NAT10*, *DAP*, *RNF2*, *FLOT2*, *FKBP10*, *SLIT3*, *EBNA1BP2*, *SLC35B2*, *MICAL2*, *GPR3*, *TSPAN17*) que parecem diferenciar estas células.

Nossos dados indicam que um processo que pode estar desregulado em células estromais de medula óssea comprometida por micrometástases é o de transcrição gênica, pois três genes diferencialmente expressos apresentam esta função.

Dentre aqueles hiperexpressos temos o gene *POLR3E* localizado no cromossomo 16 (16p12.1) que codifica um polipeptídeo necessário para a transcrição de RNAs não codificantes pela RNA polimerase III (Hu *et al*, 2002). Já o gene *NCOA6* (20q11), também hiperexpresso, codifica uma

proteína co-ativadora da transcrição que medeia as interações ligante-induzidas por receptores de hormônios nucleares. Análise por hibridização *in situ* fluorescente descreveu aumento do número de cópias deste gene em 10% das amostras de câncer de mama e em diversas linhagens de câncer de mama (Lee et al., 1999).

O gene *RNF2*, hipoexpresso nas células estromais de medula comprometida, está localizado no cromossomo 1 (1q25.3) e sua tradução codifica uma proteína do grupo *polycomb* (PcG) de multicomplexos, que são importantes para a repressão da transcrição de vários genes entre eles globinas e IL-4, por propiciarem um maior empacotamento do DNA (Pirrotta, 1998; Tuckfield et al, 2002). Estudos de ligação *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a proteína *RNF2* também é uma E3 ubiquitina ligase que interage com a enzima de conjugação da ubiquitina HIP2/hE2 (Lee et al, 2005). Além disso, outro gene também hipoexpresso, *TSPAN17* (5q35.3), é conhecido como proteína F-box e possui atividade ubiquitina-proteína ligase. Algumas proteínas F-box estão relacionadas ao controle da degradação de proteínas de regulação celular. As proteínas F-box possuem um domínio carboxi-terminal que interage com substratos e outro domínio que possui 42-48 aminoácidos ao qual se ligam proteínas Skp1 (Winston et al., 1999) . Além disso, as proteínas F-box são uma das quatro subunidades das ubiquitinas-proteínas ligases chamadas SCFs que atuam nos processos de ubiquitinação fosforilação dependente (Cenciarelli et al., 1999). Portanto, alguns transcritos envolvidos em ubiquitinação de proteínas foram menos expressos em células estromais oriundas de medula óssea comprometida.

Entre os genes relacionados ao metabolismo de proteínas celulares observamos a hipoeexpressão de *MRPL2* e *FKBP10* em células estromais de medula comprometida. *MRPL2*, localizado no cromossomo 6 (6p21.3), codifica proteína ribossomal mitocondrial que auxilia a síntese de proteínas dentro da mitocôndria, indicando que a tradução também pode estar modulada em células estromais. *FKBP10* (17q21.2) expressa o RNAm para uma proteína com propriedade peptil prolil cis/trans isomerase, localizada no retículo endoplasmático e que atua como chaperona, responsável por modificações pós-traducionais. Já o gene *MAST4* (5q12.3) que codifica uma proteína do microtúbulo associado ao membro 4 da família das serinas/treoninas quinases mostrou-se hiperexpresso.

Alterações no ciclo celular são comumente encontradas no câncer de mama, como hiperexpressão de ciclina D1 e expressão de isoforma de ciclina E, sem a terminação amina, que é hiperativa (Keyomarsi, 2002). Já na célula estromal oriunda de medula comprometida, obtivemos hiperexpressão do gene *ANAPC11* localizado no cromossomo 17 (17q25.3), um complexo promotor da anáfase com atividade ubiquitina ligase (E3) e cuja subunidade 11 funciona como sítio catalítico. Este complexo sinaliza importantes eventos no ciclo celular como a separação das cromátides irmãs e saída da mitose pela degradação via proteassoma da securina e ciclina B, respectivamente (Chan et al., 2001; Chang et al., 2004). Além do mais, Olstad et al. (2003) relataram uma elevada expressão de *ANAPC11* em osteosarcomas apontando que as células estromais também podem carregar alterações em processos neoplásicos.

O gene *PTH LH*, que codifica o hormônio símile ao paratormônio, se localizado no cromossomo 12 (12p12.1-p11.2) e está relacionado à proliferação e diferenciação celular já que culturas de queratinócitos humanos mostraram que a interferência em sua produção gera uma não maturação destas células (Kaiser et al., 1994). Estudos cujo modelo envolve camundongos transgênicos revelaram que a superexpressão de *PTH LH* pelas células mioepiteliais promove alteração da morfogênese das estruturas mamárias (Wysolmerski et al., 1998). Cros et al. (2002) relataram que a produção constitutiva desta proteína ocorre tanto em fibroblastos derivados de tecido mamário normal quanto naqueles derivados do tecido mamário tumoral. Já em relação às células estromais oriundas de medula comprometida observamos uma hiperexpressão deste gene.

A transmissão de sinais orientada pela ligação de ligantes a seus receptores e a subsequente cascata de sinalização é um evento de renomada importância, pois auxilia na regulação dos processos celulares. A hipoexpressão do gene *GPR3* (1p36.1-p35), proteína relacionada ao receptor acoplado à proteína G que auxilia na sinalização gerada pela ligação do ligante, foi encontrada em células estromais oriundas de medula comprometida.

Alguns comportamentos anormais pertencentes às células tumorais são atribuídos a uma glicosilação alterada das moléculas de superfície celular, gerando mudanças nas interações célula-célula e célula-matriz. O transcrito do gene *B4GALT5* (20q13.1-q13.2) atua no metabolismo de carboidratos pela transferência de um grupo galactosil a um outro carboidrato ou lipídeo. A hipoexpressão de *B4GALT5* na linhagem SHG de astrocitoma levou ao

fortalecimento da interação entre $\alpha 5$ e $\beta 1$ (Sato et al., 2000; Chen et al., 2006), e uma hiperexpressão deste gene diminuiu o agrupamento da adesão mediada por $\alpha 5\beta 1$, promovendo motilidade celular (Guo et al., 2002). É possível que a presença da célula micrometastática na medula possa estar contribuindo para sua hiperexpressão na célula estromal.

O gene *FLOT2*, o qual se encontra hipoexpresso na célula estromal oriunda de medula óssea comprometida, está localizado no cromossomo 17 (17q11-q12) e codifica uma proteína integral de membrana associada a caveolina. Proteínas caveolares atuam como microdomínios dinâmicos e detergentes que juntam diversas moléculas sinalizadoras dentro de distintas áreas da membrana plasmática para regular a transmissão de sinal induzido por citocinas (Engelman et al, 1999; Razandi et al, 2003).

A síntese de proteínas e o seu transporte traduzem ações importantes para o processo fisiológico celular. Deste modo, obtivemos superexpressão do gene *TLOC1* (3q23.2) na célula estromal oriunda de medula comprometida que codifica uma proteína integral da membrana do retículo endoplasmático rugoso. Especula-se que sua atuação no retículo endoplasmático está relacionada à translocação pós-traducional de proteínas. Jung et al. (2006) detectaram uma amplificação desta região em câncer de próstata, além de um aumento no número transcritos para *TLOC1*. Outro gene hiperexpresso também relacionado ao transporte é o *CPNE1* (20q11.22) que codifica uma proteína dependente de cálcio amplamente distribuída nos tecidos e que pode atuar no transporte de membrana, enquanto os genes *MICAL2* (11p15.3) e *SLC35B2* (6p12.1-p11.2),

relacionam-se, respectivamente, ao transporte de elétrons e de solutos, sendo este último também integrante da cascata de regulação do NF- kappa B.

Os ribossomos são organelas essenciais para os processos fisiológicos celulares. A análise de células estromais oriundas de medula comprometida nos revelaram a hipoexpressão do gene *EBNA1BP2*, localizado no cromossomo 1 (1p35-p33), o que pode sugerir alteração no metabolismo desta célula, já que esta é uma proteína de ligação requerida para o processamento da porção 27S do pré-rRNA. Smirnov *et al* (2005) observaram o perfil molecular das células tumorais circulantes de câncer de mama, próstata e cólon e encontraram uma expressão duas vezes maior desta proteína na célula tumoral mamária e prostática.

Observamos outros genes hipoexpressos em células estromais de medula comprometida, *SLIT3*, *NAT10* e *DAP*. O gene *SLIT3*, homólogo ao *slit 3* da *Drosophila*, localizado no cromossomo 5 (5q35), parece desempenhar um papel crítico na formação do sistema nervoso, e que codifica uma proteína contendo domínios conservados de interação proteína- proteína incluindo repetições ricas em leucina e domínios similares ao fator de crescimento epidermal símile (Itoh *et al.*, 1998). Além disso, *NAT10*, localizado no cromossomo 11 (11p13), codifica uma proteína catalisadora da transferência de um grupo acetil para um átomo de nitrogênio na molécula aceptora e o gene *DAP*, localizado no cromossomo 5 (5p5.2), que codifica uma proteína serina/treonina quinase envolvida em processos de apoptose celular (Inbal *et al.*, 2000). Em câncer de mama a sua hipermetilação foi associada a um subtipo de carcinoma lobular invasor

(Lehmann et al., 2002), e ainda, a sua baixa expressão imunohistoquímica correlacionou-se negativamente com sobrevivência enquanto sua positividade demonstra um aumento da chance de recidiva (Lévy et al., 2004), entretanto, em células estromais sua atuação ainda não foi determinada.

Outra consideração refere-se ao comportamento da doença. A presença de metástases ósseas é um achado clínico freqüente nas pacientes com câncer de mama. Assim, as células tumorais tendem a apresentar uma infiltração maciça na região das trabéculas ósseas que, ocasionam até fraturas patológicas. Entretanto, a região endosteal do osso composta internamente pela medula óssea parece não ser propícia para proliferação maciça pelas células tumorais disseminadas de modo a causar pancitopenia nas pacientes com câncer de mama. Desta forma é válido especular que o estroma medular poderia influenciar esta característica, visto que as células que penetraram nos ossos podem ser homólogas àquelas que penetraram na medula óssea, ou ainda, pode ser que estas células primeiramente penetraram na medula óssea, região mais ricamente vascularizada e que apresenta um aumento de microvasos nas pacientes que apresentam câncer de mama (Chaves-Macgregor et al., 2005) para depois se encaminharem para os ossos, contudo não há dados que indiquem este percurso. Fato é que cerca de 20 a 40% das pacientes com câncer de mama sem qualquer sinal clínico ou histopatológico de metástase, ou ainda, sem comprometimento de linfonodos, mas com presença de células tumorais ocultas na medula óssea, apresentam risco aumentado para recidiva da doença e menor sobrevida global (Schoenfeld et al., 1997;

Funke et al., 1998; Braun et al., 2000, Pantel et al., 2003; Weinschenker et al., 2004, Braun et al., 2005; Weigelt et al., 2005).

É possível que células estromais de medula óssea na presença ou ausência de células tumorais ocultas tenham comportamento semelhante, pois a presença de células isoladas não causou grandes diferenças em seu perfil gênico. Por outro lado, estas diferenças podem ser significativas no processo de adesão e na possível característica não proliferativa destas células tumorais no sítio medular, ou ainda, a infiltração maciça da medula óssea pode estar relacionada a um ambiente permissivo para o desenvolvimento de metástase influenciado pelas células tumorais.

Ainda é válido relatar que as células estromais estudadas retiveram estas pequenas diferenças em seu perfil de expressão gênico mesmo após o longo período de cultivo sob condições padrão, igualmente executadas em todas as células cultivadas. Assim, isto pode indicar uma modificação intrínseca de uma célula precursora (*stem cell*) previamente alterada, ou uma modificação das características das células estromais durante o contato das mesmas com as células tumorais *in vivo*, ou também uma seleção de uma subpopulação de células estromais. De qualquer forma, conclui-se que as células estromais oriundas de medula comprometida por células micrometastáticas guardam características semelhantes às células estromais oriundas de medula não comprometida, mas com algumas diferenças.

6. Conclusões

1. Identificamos a presença de células epiteliais tumorais disseminadas em aspirado de medula óssea de 4 pacientes com câncer de mama pela expressão de citoqueratina 19 por reação em cadeia da polimerase do tipo *Nested*.
 2. Estabeleceu-se com sucesso a cultura primária de células estromais de medula óssea comprometida ou não por células tumorais disseminadas, sendo a homogeneidade destas células confirmada pela expressão imunocitoquímica positiva para vimentina e negativa para pan-citoqueratinas e antígeno leucocitário.
 3. Observou-se 21 genes diferencialmente expressos entre células estromais oriundas de medula óssea comprometida em relação àquelas oriundas de medula óssea não comprometida por células epiteliais tumorais disseminadas. Os genes diferencialmente expressos estavam envolvidos no metabolismo de macromoléculas, histogênese, apoptose, transporte de moléculas, regulação da transcrição e comunicação celular, segundo classificação ontológica.
 4. Nossos dados indicam que a expressão gênica de células estromais oriundas de medula óssea comprometida ou não por micrometástases são células que guardam características semelhantes entre si, mas com algumas diferenças.
-

7. Anexo

Tabela 07. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos em células estromais oriundas de medula óssea comprometida em relação àquelas não comprometidas das pacientes com câncer de mama segundo análise pelo “Onto-Express”

Categorias funcionais	Símbolos dos genes diferencialmente expressos	Número de genes diferencialmente selecionados dentro das categorias funcionais	Número de genes totais dentro das categorias funcionais*	**Valor de p:
Indução da apoptose por sinais extracelulares	<i>DAP</i>	1	7	0,0006677
Desenvolvimento epidermal	<i>PTHLH</i> <i>FLOT2</i>	2	18	0,0002096
Ubiquitinação de proteínas	<i>ANAPC11</i> <i>RNF2</i> <i>TSPAN17</i>	3	84	0,0007990
Empacotamento de proteínas	<i>FKBP10</i>	1	59	0,0098569
Sinalização via proteína G, via de ativação da adenilato ciclase	<i>GPR3</i>	1	1	1,865174 $\times 10^{-14}$
Regulação positiva da cascata de NF-kappaB	<i>SLC35B2</i>	1	24	0,0036813
Transporte de elétrons	<i>MICAL2</i>	1	70	0,0129246
Biosíntese de proteínas	<i>MRPL2</i>	1	63	0,0108150
Diferenciação celular	<i>SLIT3</i>	1	53	0,0089635
Síntese de ribossomos	<i>EBNA1BP</i>	1	6	0,0005979
Resposta ao estímulo hormonal	<i>NCOA6</i>	1	1	1,243449 $\times 10^{-14}$
Transporte mediado por vesículas	<i>CPNE1</i>	1	19	0,0037478
Via secretória: modificação de proteínas no retículo endoplasmático	<i>TLOC1</i>	1	4	0,0002887
Metabolismo de proteínas celulares: fosforilação de aminoácidos	<i>MAST4</i>	1	186	0,0507743
Regulação da transcrição	<i>POLR3E</i>	3	293	0,0142168
Metabolismo de carboidratos	<i>B4GALT5</i>	1	59	0,0099976
Desconhecida	<i>C17orf57</i> <i>NAT10</i>			0,0081550

*Número de genes totais imobilizados na lâmina de cDNA microarray dentro das categorias funcionais relacionadas acima. ** Nível de significância atribuído às várias categorias funcionais.

8. Referências

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

Balduino A, Hurtado SP, Frazão P, Takiya FP, Alves LM, Nasciutti L, El-Cheikh MC, Borojevic R. Bone marrow subendosteal microenvironment harbours functionally distinct haemosupportive stromal cell populations. *Cell Tissue Res*. 2005; 319: 255–266.

Benoy IH, Elst H, Philips M, Wuyts H, Van Dam P, Scharpe S, Van Marck E, Vermeulen PB, Dirix LY. Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer*. 2006; 94(5):672-80.

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

Berois N, Varangot M, Aizen B, Estrugo R, Zarantonelli L, Fernández P, Krygier G, Simonet F, Barrios E, Musè I, Osinaga E. Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patients with operable breast cancer. Comparison of CK 19, MUC 1 and CEA using RT-PCR. *Eur. J. Cancer*. 2000, 36: 717-723.

Bhowmick NA, et al. TGF- β signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science*. 2004; 303: 848–851.

Braun S, Pantel K. Biological characteristics of micrometastatic cancer cells in bone marrow. *Cancer Metastasis Rev*. 1999;18(1):75-90.

Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Heep F, Kentenich CRM, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller, Schlimok G. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer. *N Engl J Med*. 2000; 342(8):525-33.

Braun S, Pantel K. Diagnosis and clinical significance of disseminated tumor cells in bone marrow. *Dtsch Med Wochenschr*. 2000;125(41):1237-9.

Braun S, Naume B. Circulating and disseminated tumor cells. *J Clin Oncol*. 2005; 23(8):1623-6.

- Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(8):793-802.
- Brooks B, Bundred NJ, Howell A, LANG SH, Testa NG. Investigation of mammary epithelial cell - bone marrow stroma interactions using primary human cell culture as a model of metastasis. *Int. J. Cancer*. 1997; 73: 690-696.
- Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst*. 1974. 53, 661–674.
- Camps JL, Chang SM, Hsu TC, Freeman MR, Hong SJ, Zhau HE, von Eschenbach AC, Chung LW. Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(1):75-9.
- Cenciarelli C, Chiaur DS, Guardavaccaro D, Parks W, Vidal M and Pagano M. Identification of a family of human F-box proteins. *Current Biology*. 1999, 9:1177–1179.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002 ;(8):563-72.
- Chan AH, Lee SM, Chim SS, Kok LD, Waye MM, Lee CY, Fung KP, Tsui SK. Molecular cloning and characterization of a RING-H2 finger protein, ANAPC11, the human homolog of yeast Apc11p. *J Cell Biochem*. 2001 Aug 1-9;83(2):249-58.
- Chang TS, Jeong W, Lee DY, Cho CS, Rhee SG. The RING-H2-finger protein APC11 as a target of hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(4):521-30.
- Chavez-Macgregor M, Aviles-Salas A, Green D, Fuentes-Albuero A, Gomez-Ruiz C, Aguayo A. Angiogenesis in the bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(15):5396-400.
- Chen X, Jiang J, Yang J, Chen C, Sun M, Wei Y, Guang X, Gu J. Down-regulation of the expression of beta1,4-galactosyltransferase V promotes integrin beta1 maturation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(3):910-6.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156-9.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(8):781-91.
-

Cros M, Cataisson C, Cho YM, Berthois Y, Bernard-Poenaru O, Denne M, Graulet AM, De Vernejoul MC, Foley J, Bouizar Z. Constitutive production of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) by fibroblasts derived from normal and pathological human breast tissue. *Oncol Res*. 2002;13(3):137-46.

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

Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1): methylation of a CpG island in the 5P promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Letters*. 1999; 448: 221-230.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 2003.

Fierro FA, Sierralta WD, Epanan MJ, Minguell JJ. Marrow-derived mesenchymal stem cells: role in epithelial tumor cell determination. *Clin Exp Metastasis*. 2004;21(4):313-9.

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(20):7231-6.

Funke I, Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol*. 1998, 16(2):557-66.

Gilbey AM, Burnett D, Coleman RE, Holen I. The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Pathol*. 2004;57(9):903-11.

Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003, 21(17):3357-65.

Guo HB, Lee I, Kamar M, Akiyama SK and Pierce M, Aberrant N-glycosylation of beta1 integrin causes reduced alpha5beta1 integrin clustering and stimulates cell migration. *Cancer Res*. 2002, 6837-6845.

Hayes DF. Markers of increased risk for failure of adjuvant therapies. *Breast*. 2003;12:S14 (suppl 1, abstr S37).

Harris RA, Hiles ID, Page MJ, O'Hare MJ. The induction of apoptosis in human mammary luminal epithelial cells by expression of activated c-neu and its abrogation by glucocorticoids. *Br J Cancer*. 1995;72(2):386-92.

Harris RA, Eichholtz TJ, Hiles ID, Page MJ, O'Hare MJ. New model of ErbB-2 over-expression in human mammary luminal epithelial cells. *Int J Cancer*. 1999; 80(3):477-84.

Hombauer H, Minguell JJ. Selective interactions between epithelial tumour cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Cancer*. 2000;82(7):1290-6.

Hu P, Wu S, Sun Y, Yuan CC, Kobayashi R, Myers MP, Hernandez N. Characterization of human RNA polymerase III identifies orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III subunits. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(22):8044-55.

INCA-Ministério da Saúde, Brasil, dados disponíveis na Internet. www.inca.org.br

Ismail MS, Wynendaele W, Aerts JL, Paridaens R, Gaafar R, Shakankiry N, Khaled HM, Christiaens MR, Wildiers H, Omar S, Vandekerckhove P, Van Oosterom AT. Detection of micrometastatic disease and monitoring of perioperative tumor cell dissemination in primary operable breast cancer patients using real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Clin Cancer Res*. 2004;10(1 Pt 1):196-201.

Itoh A, Miyabayashi T, Ohno M, Sakano S. Cloning and expressions of three mammalian homologues of *Drosophila* slit suggest possible roles for Slit in the formation and maintenance of the nervous system. *Molec. Brain Res*. 1998; 62: 175-186.

Jung V, Kindich R, Kamradt J, Jung M, Muller M, Schulz WA, Engers R, Unteregger G, Stockle M, Zimmermann R, Wullich B. Genomic and expression analysis of the 3q25-q26 amplification unit reveals TLOC1/SEC62 as a probable target gene in prostate cancer. *Mol Cancer Res*. 2006; 4(3):169-76.

Kaiser SM, Laneuville P, Rhim JS, Kremer R, Goltzman D. Antisense mediated inhibition of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) production in a keratinocyte cell line impedes differentiation. *Mol Endocrinol*. 1994; 8: 277-289.

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(5):392-401.

Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, Bedrosian I, Knickerbocker C, Toyofuku W, Lowe M, Herliczek TW, Bacus SS. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med*. 2002; 347(20):1566-75.

Kim DH, Yoo KH, Choi KS, Choi J, Choi SY, Yang SE, Yang YS, Im HJ, Kim KH, Jung HL, Sung KW, Koo HH. Gene expression profile of cytokine and

growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine*. 2005;31(2):119-26.

Korah R, Boots M, Wieder R. Integrin alpha5beta1 promotes survival of growth-arrested breast cancer cells: an in vitro paradigm for breast cancer dormancy in bone marrow. *Cancer Res*. 2004;64(13):4514-22.

Korah R, Choi L, Barrios J, Wieder R. Expression of FGF-2 alters focal adhesion dynamics in migration-restricted MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;88(1):17-28.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez P and Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98. 2001;12072-12077.

Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L, Richardson A, Weinberg RA. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(14):4966-71.

Lee SK, Anzick SL, Choi JE, Bubendorf L, Guan XY, Jung YK, Kallioniemi OP, Kononen J, Trent JM, Azorsa D, Jhun BH, Cheong JH, Lee YC, Meltzer PS, Lee JW. A nuclear factor, ASC-2, as a cancer-amplified transcriptional coactivator essential for ligand-dependent transactivation by nuclear receptors in vivo. *J Biol Chem*. 1999;274(48):34283-93.

Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H et al. Characterization and Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004; 311-324.

Lee SJ, Choi D, Rhim H, Kang S. E3 ubiquitin ligase RNF2 interacts with the S6' proteasomal ATPase subunit and increases the ATP hydrolysis activity of S6'. *Biochem J*. 2005; 389:457-63.

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

Lehmann U, Celikkaya G, Hasemeier B, Länger F, Kreipe H. Promoter Hypermethylation of the *Death-associated Protein Kinase* Gene in Breast Cancer Is Associated with the Invasive Lobular Subtype. *Cancer Research* 2002;62:6634–6638.

Lévy D, Plu-Bureau G, Decroix Y, Hugol D, Rostène W, Kimchi A, Anne Gompel A. Death-Associated Protein Kinase Loss of Expression Is a New Marker for Breast Cancer Prognosis. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 3124-3130.

Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long follow-up study. *The Lancet*. 1999; 354:195-200.

Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 584-593.

Nicola MHA, Bizon R, Machado JJS, Sollero T, Rodarte RS, Nobre JS, Magalhães MM, Takiya CM, Borojevic R. Breast cancer micrometastases: Different interactions of carcinoma cells with normal and cancer patients' bone marrow stromata. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20:471-79.

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(3):209-21.

Olumi, AF et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*. 1999;59, 5002–5011.

Orimo, A. *et al*. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005; 121, 335–348

Olstad OK, Gautvik VT, Reppe S, Rian E, Jemtland R, Ohlsson C, Bruland OS, Gautvik KM. Molecular heterogeneity in human osteosarcoma demonstrated by enriched mRNAs isolated by directional tag PCR subtraction cloning. *Anticancer Res*. 2003; 23(3B):2201-16.

Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85(17):1419-24.

Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(6):448-56.

Pantel K, Muller V, Auer M, Nusser N, Harbeck N, Braun S. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(17):6326-34.

Piccart MJ: New data on chemotherapy in the adjuvant setting. *Breast* 12:S4, 2003 (suppl, abstr S5).

Pirrotta V. Polycomb the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. *Cell*. 1998. 93:333-336.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999, vol284.

Khatri P, Drăghici S. Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics*. 2005; 21(18): 3587-3595.

Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb P, Levin ER. Identification of a structural determinant necessary for the localization and

function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(5):1633-46.

Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev.* 1996; 76(1):69-125.

Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood.* 1993;82:2605–10.

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(1):R46-59.

Sato T, Shirane K, Kido M and Furukawa K, Correlated gene expression between beta-1,4-galactosyltransferase V and N-acetylglucosaminyltransferase V in human cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;276: 1019–1023.

Seshi B, Kumar S, King D. Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells as evidenced by single-cell microarray analysis. *Blood Cells Mol Dis.* 2003;31(2):268-85.

Seshi B, Kumar S, Sellers D. Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis.* 2000;26(3):234-46.

Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J, et al. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. *Eur J Cancer* 1997;33:854–61.

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, 1320-1326.

Slade MJ, Smith BM, Sinnett HD, Cross NCP, Coombs RC. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17: 870-879.

Sloan EK and Anderson RL. Genes involved in breast cancer metastasis to bone. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2002; 59:1491–1502.

Smirnov DA, Zweitzig DR, Foulk BW, Miller MC, Doyle GV, Pienta KJ, Meropol NJ, Weiner LM, Cohen SJ, Moreno JG, Connelly MC, Terstappen

LW, O'Hara SM. Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res.* 2005;65(12):4993-7.

Sohara Y, Shimadab H, DeClercka YA. Mechanisms of bone invasion and metastasis in human neuroblastoma. *Cancer Letters.* 2005;228(1-2):1-7.

Stamps AC, Davies SC, Burman J, O'hare MJ, Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalised by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. *Int. J. Cancer*, 1994; 57:1–10 .

Tuckfield A, Clouston DR, Wilanowski TM, Zhao LL, Cunningham JM, Jane SM. Binding of the RING polycomb proteins to specific target genes in complex with the grainyhead-like family of developmental transcription factors. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(6):1936-46.

Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng.* 2005;100(1):12-27.

Vêncio RZ, Koide T. HTself: Self-self based statistical test for low-replication microarray studies. *DNA Research.* 2005, 12:211-214.

Volgestein B, Kinzler K. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993, 9, 138-141.

Wang TN, Albo D, Tuszynski GP. Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloproteinase-9 production. *Surgery.* 2002; 132(2):220-5.

Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast Metastasis:Markers And Models. *Nat Rev Cancer.* 2005. 5:591-602.

Weinschenker P, Soares HP, Clark O, Del Giglio A. Immunocytochemical detection of epithelial cells in the bone marrow of primary breast cancer patients: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;87(3):215-24.

Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21(18):3469-78.

Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5342-8.

Winston JT, Koeppe DM, Zhu C, Elledge SJ and Harper JW. A family of mammalian F-box proteins. *Current Biology.* 1999, 9:1180–1182.

Woelfle U, Cloos J, Sauter G, Riethdorf L, Janicke F, van Diest P, Brakenhoff R, Pantel K. Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res.* 2003;63:5679–5684.

Woelfle U, Sauter G, Santjer S, Brakenhoff R, Pantel K. Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(8):2670-4.

Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly express functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood.* 2004.

Wysolmerski JJ, Philbrick WM; Dunbar ME; Lanske B; Kronenberg H; Broadus, AE. Rescue of the parathyroid hormone-related protein knockout mouse demonstrates that parathyroid hormone-related protein is essential for mammary gland development. *Development* 1998; 125: 1285-1294.

Zhu L, Loo WT, Chow LW. Circulating tumor cells in patients with breast cancer: possible predictor of micro-metastasis in bone marrow but not in sentinel lymph nodes. *Biomed Pharmacother.* 2005;59 S2:S355-8.

Apêndice

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Estudo: Expressão gênica diferencial entre células epiteliais e células estromais de medula óssea de pacientes com câncer de mama mantidas em co-cultura”.

INFORMAÇÕES A(O) PACIENTE

INTRODUÇÃO:

Este documento fornece uma descrição do tratamento do qual você está sendo convidada a participar. Também resume as informações atualmente disponíveis em relação às condutas a serem avaliadas.

A senhora está sendo convidada a participar de um estudo em pesquisa clínica. Os médicos deste Hospital estão estudando a biologia e evolução clínica do câncer de mama e no futuro será possível que a melhor compreensão do comportamento da doença permita uma forma de tratamento mais efetiva; e auxiliem na tentativa de aprimorar métodos de tratamento a respeito da biologia do câncer.

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

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

O tratamento a ser realizado é aquele feito como rotina neste hospital. Este estudo em nada vai interferir com o tratamento.

OBJETIVO DO ESTUDO:

A pesquisa proposta é a seguinte: “Expressão gênica diferencial entre células epiteliais e células estromais de medula óssea de pacientes com câncer de mama mantidas em co-cultura”.

O câncer de mama inicia-se na própria mama, mas pode atingir outros órgãos como fígado, ossos, pulmões e medula óssea. Pretendemos nesta pesquisa estudar fatores que possam influenciar o aparecimento de células tumorais na medula óssea durante a evolução do câncer de mama. Para isso é necessário um procedimento não usual: a coleta de material da medula óssea, entretanto, este será colhido quando for realizado o tratamento cirúrgico da mama, isto é, quando a senhora já estiver anestesiada.

A medula óssea está localizada dentro de alguns ossos, e é a responsável pela produção de células do sangue. Os fibroblastos, isto é, as células que mantêm a estrutura da medula, podem fornecer substâncias que façam com que as células tumorais se mantenham na medula óssea ou sejam eliminadas deste local. Pretendemos separar estes fibroblastos da medula óssea e cultivá-los dentro de recipientes apropriados contendo nutrientes para permitir a sobrevivência e proliferação dos mesmos. Estas células serão expandidas e posteriormente, mantidas num sistema de congelamento adequado, constituindo assim, um banco de fibroblastos de medula óssea. A nossa intenção neste estudo é estudar a interação entre os fibroblastos e as células tumorais. Para isto, avaliaremos a expressão gênica através da técnica de cDNA microarray. Esta é uma tecnologia que permite a análise de centenas a milhares de genes em um mesmo experimento.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO, DESCONFORTOS E RISCOS/ EFEITOS ADVERSOS:

Será realizada a cirurgia (retirada da mama ou de parte dela, e linfonodos) para o tratamento da doença. O tratamento, em si, será o de rotina. Um procedimento não usual é a coleta do material da medula óssea, entretanto, este será colhido quando for realizado o tratamento cirúrgico da mama. Durante a cirurgia, quando a senhora estiver anestesiada, será feito um pequeno corte de 0,5 cm (---) no esterno, o osso situado entre as mamas, e será introduzida uma agulha para coletar um pouco da medula óssea que é nada a mais do que a amostra semelhante a um sangue mais espesso (denso), que corresponde aos fibroblastos e às células produtoras dos componentes sanguíneos. Como resultado deste procedimento o máximo que pode ocorrer é um pequeno hematoma no local da coleta.

Forma de acompanhamento e assistência e seus responsáveis

Todas as pacientes serão acompanhadas de forma habitual no hospital. A médica responsável pela coleta do material será Dra. Ana Paula Santana de Abreu. Em caso de dúvida, consulte o investigador principal: Dra Ana Paula Santana de Abreu. Endereço: Rua Bela Cintra, 167 ap131. Telefones para contato: 3257-3155 ou 9276-0988. E/ou Cíntia Milani. Endereço: Av. Dr. Arnaldo, 455, 4º andar, sala 4112. Telefone: 3066-7487.

PROVÁVEIS BENEFÍCIOS:

Este protocolo de pesquisa provavelmente não implicará em benefícios para o tratamento da doença da senhora. Por outro lado, é possível que o estudo permita uma melhor compreensão da doença, que no futuro poderá acarretar uma melhor abordagem terapêutica da doença.

CONFIDENCIALIDADE E PRIVACIDADE :

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

Como se trata de um estudo investigativo, sua identidade será mantida em segredo. Seu nome não será utilizado em qualquer publicação que resulte do estudo.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:

Este estudo não irá interferir no tratamento da senhora. O tratamento será aquele convencional para este tipo de doença neste estágio que a senhora se apresenta. Portanto, a senhora não receberá qualquer tipo de ressarcimento ou indenização por complicações ou seqüelas causadas pelo tratamento, desde que o objetivo do presente trabalho é apenas colher medula óssea e em nada interferirá em seu tratamento.

A participação neste estudo não trará qualquer despesa para a senhora e também não há qualquer compensação financeira pela sua participação.

PROTEÇÃO DA PACIENTE :

- Comitê de Ética :

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

O Comitê forneceu sua aprovação antes de iniciar este tratamento. Em caso de dúvida entrar em contato com a Dra. Célia Tosello de Oliveira – Coordenadora do CEP ou Dr. José Costa de Andrade – Secretário do CEP através do telefone: 6099-3999 ramal 3935.

SEUS DIREITOS:

A escolha de entrar ou não neste estudo é inteiramente sua. Se aceitar, você poderá abandonar o estudo a qualquer momento sem ter que fornecer qualquer razão que justifique sua decisão. Além do mais, seu médico terá que lhe avisar se novas informações estiverem disponíveis e forem relevantes para o seu desejo em continuar a participar deste tratamento.

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

Em caso de dúvida, consulte o investigador principal: Dra Ana Paula Santana de Abreu. Endereço: Rua Bela Cintra, 167 ap131. Telefones para contato: 3257-3155 ou 9276-0988. E/ou Cíntia Milani. Endereço: Av. Dr. Arnaldo, 455, 4º andar, sala 4112. Telefone: 3066-7487.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Título do Projeto: **Expressão gênica diferencial entre células epiteliais e células estromais de medula óssea de pacientes com câncer de mama mantidas em co-cultura**”.

SEÇÃO DO INVESTIGADOR: (a ser preenchido pelo investigador)

Nome do investigador:..... Local :.....
Pessoa de contato :..... Número do
telefone:.....

Confirmo que expliquei o estudo clínico detalhadamente à paciente. Forneci uma folha de informações e respondi a todas as perguntas que a paciente tinha em relação ao estudo.

Assinatura.....Data.....

SEÇÃO DA PACIENTE: (a ser preenchida pela paciente)

Código da paciente*

Nome da paciente.....

Endereço

.....

Telefone.....

SEÇÃO DO REPRESENTANTE LEGAL DA PACIENTE:

(quando necessário à autorização através de outra pessoa que não a paciente. A ser preenchida por este representante).

Grau de parentesco com a paciente:.....

Nome do representante legal.....

Recebi, li e entendi a **Folha de Informação do Paciente** para o tratamento acima. Também recebi uma explicação adequada sobre este estudo clínico, seus propósitos, riscos e sobre meus direitos como paciente e o que será feito por mim.

Eu tive a oportunidade de fazer perguntas antes de tomar qualquer decisão. Poderei solicitar ao meu médico informações adicionais a qualquer momento.

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

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

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

Com base nisso, autorizo minha participação neste tratamento.

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

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