Laura Tojeiro Campos

**Perfil de expressão gênica de
fibroblastos associados ao câncer de
mama submetidos ao tratamento com
vitamina D**

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

Programa de: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Mitzi
Brentani

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Campos, Laura Tojeiro

Perfil de expressão gênica de fibroblastos associados ao câncer de mama submetidos ao tratamento com vitamina D / Laura Tojeiro Campos. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Oncologia.

Orientadora: Maria Mitzi Brentani.

Descritores: 1.Calcitriol 2.Fibroblastos 3.Neoplasias da mama 4.Perfilação da expressão gênica 5.Análise de sequência com séries de oligonucleotídeos

USP/FM/DBD-435/10

*Dedico esta dissertação aos meus pais, Amilton e Renata, e às
minhas irmãs, Raquel e Fernanda, por compreenderem a minha
ausência, por incentivarem os meus estudos, pelo amparo nos momentos
difíceis e por me ensinarem o verdadeiro significado de dedicação,
persistência, respeito e amor!...
Muito Obrigada!*

Amo muito vocês!!!

À minha orientadora Dra. Mitzi Maria Brentani pela dedicação e excelência com que me orientou durante todo o mestrado e pela oportunidade de aprendizado e vivência.

Ao Dr. Roger Chammas, coordenador do programa de pós-graduação em Oncologia pela admissão no programa e pela excelente coordenação do mesmo.

À Dra. Rosimeire Roela pelos valiosos conhecimentos cedidos e também pela paciência, apoio e ajuda durante a realização de inúmeros experimentos.

Às Dras. Lucia Hirata Katayama, Patrícia Bortman Rozencham, Flávia Mangone e Fátima Pasini, ao Dr. Igor Snitkovisky e a Profa. Dra. Maria Aparecida Koike Folgueira pelos inúmeros ensinamentos que todos vocês me proporcionaram.

Aos meus parceiros de bancada e “Senzala”: Adriana Priscila Trapé, Elen Pereira Bastos, Karina Augusto Escobar, Natália Bromberg, Paulo DelValle, Simone Crestoni Fernandes, Victor Celso e Yuri Urata. A todos aqueles que passaram pelo laboratório: Arthur Willian Alvarenga, Bruno Cadima, Camila Máximo, Carla Pinheiro, Cíntia Milani, Iara Sant’Ana Rodrigues, Karen Cristina Sant’Anna Brunialti, Lílian Barbeta, Juliana Yamagushi, Mateus Barros, Suzana Honda. Muito obrigada pelos agradáveis momentos compartilhados e pela ajuda na realização do trabalho. Agradeço também pelo carinho e pela amizade.

À Maria José Benevides, Elizangela Dias e Rosilene Arruda pela atenção a mim dedicada e pelo auxílio.

Aos funcionários Jair Cláudio e Willame Macedo por proporcionar um ambiente de trabalho apropriado.

À funcionária Ivonete Lima por toda a ajuda prestada e pelos momentos de descontração.

A todos os integrantes dos grupos Adesão Celular e Cultura Celular pelo companheirismo.

A todas as pacientes que contribuíram com material biológico empregado neste estudo.

À Dra. Ana Lúcia pela captura de imagens utilizando microscopia confocal e pelos conselhos para otimização do protocolo de imunofluorescência.

Ao André pelo apoio, incentivo, imensa paciência e principalmente pelo carinho. Um grande companheiro que está sempre ao meu lado.

Aos maravilhosos amigos da XXXIX turma de Biomedicina UNESP Botucatu que fazem parte do meu passado e do meu presente.

A toda minha família pela paciência em tolerar a minha ausência, pelo incentivo e amparo nos momentos difíceis e por torcerem sempre por mim.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo espaço e estrutura cedidos.

À FAPESP e ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíra para a realização deste trabalho, mas que, por problemas de memória, não foram citados.

SUMÁRIO

Lista de Unidades	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas e Quadros	
RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Câncer de Mama.....	02
1.2. Vitamina D.....	05
1.3. Estroma tumoral e câncer.....	13
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivos Gerais.....	25
2.2. Objetivos Específicos.....	25
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	26
3.1. Comitê de Ética.....	27
3.2. Casuística.....	27
3.3. Cultura primária de fibroblastos humanos.....	28
3.4. Caracterização da cultura primária.....	29
3.5. Determinação dos receptores de vitamina D.....	30
3.6. Tratamento com vitamina D ₃	30
3.7. Citometria de Fluxo.....	31
3.8. Tecnologia do oligo <i>microarray</i>	35
3.9. RT-PCR em Tempo Real.....	54
3.10. Correlação entre os dados resultantes das técnicas de <i>microarray</i> e RT-PCR em tempo real.....	62
4. RESULTADOS.....	63
4.1. Cultura de células.....	64
4.2. Reações de imunofluorescência	65

4.3.	Tratamento com vitamina D ₃	73
4.4.	Citometria de Fluxo.....	75
4.5.	Hibridização em oligo <i>microarray</i>	76
4.6.	Análise da qualidade dos dados (<i>GCOS</i>).....	82
4.7.	Análise dos dados de oligo <i>microarrays</i>	87
4.8.	Classificação dos dados de <i>microarray</i> em processos biológicos.....	92
4.9.	Seleção dos genes candidatos à validação por RT-PCR em tempo real.....	101
4.10.	RT-PCR em Tempo Real.....	104
4.11.	Correlação entre os dados resultantes das técnicas de <i>microarray</i> e RT-PCR em tempo real.....	115
5.	DISCUSSÃO	118
6.	CONCLUSÃO	132
7.	ANEXOS	134
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

LISTA DE UNIDADES

°C	graus Celsius
g	força de gravidade (aceleração centrípeta)
M	molar
m²	metro quadrado
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
ng	nanograma
nM	nanomolar
rpm	rotação por minuto
U	Unidade
μL	microlitro
μM	micromolar
=	igual a
>	maior
<	menor

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AJCC	Comitê Americano Junto ao Câncer
AML	Actina do músculo liso tipo α
ATP	Adenosina trifosfato
C	Citosina
CAF	Fibroblasto associado ao câncer
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD34	Marcador de angiogênese
cDNA	DNA complementar
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CK	Citoqueratina
cRNA	RNA complementar
Ct	Ciclo limiar
CTRL	Controle
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Meio Dulbecco Modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados (desoxi-adenosina, desoxi-citidina, desoxi-guanosina e desoxi-timidina)
DTT	Ditiotreitol
ER	Receptor de estrógeno
FAC	Fibroblasto associado ao câncer
FNAC	Fibroblasto normal adjacente ao câncer
G	Guanina
GH	Grau histológico
HB4a	Linhagem celular epitelial mamária humana derivada de mamoplastia

HER2	Receptor do fator de crescimento humano epidermal 2
IBCC	Instituto Brasileiro de Controle do Câncer
IDC	Carcinoma ductal invasivo
ILC	Carcinoma lobular invasivo
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LCIS	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
LN	Linfonodos
In	Logaritmo natural
MCF-7	Linhagem celular epitelial mamária proveniente de adenocarcinoma mamário
MDA-MB-231	Linhagem celular epitelial tumorigênica proveniente de adenocarcinoma mamário
MEC	Matriz extracelular
n	Número
P	Nível de significância estatística
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Iodeto de propídio
RIN	Número de integridade do RNA
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
RNA_m	RNA mensageiro
RT	Transcrição reversa
RXR	Receptor de ácido retinóico
SBR	Escala Scarff-Bloom-Richardson
SFB	Soro fetal bovino
T	Timina
TCLE	Termo de consentimento Livre Esclarecido
TH	Tipo histológico
UICC	União Internacional Contra o Câncer
VD	Vitamina D

VD₃	Forma ativa da vitamina D, também denominada calcitriol
VDR	Receptor de vitamina D
VDRE	Elemento de resposta ao receptor de vitamina D
VIM	Vimentina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Metabolismo da Vitamina D.....	6
Figura 2	- Ativação do VDR.....	8
Figura 3	- Progressão tumoral.....	14
Figura 4	- Ativação do fibroblasto.....	18
Figura 5	- Histograma representativo da distribuição das células nas fases do ciclo celular após aquisição dos dados por Citometria de Fluxo.....	34
Figura 6	- <i>Dot-plot</i> (FL2A <i>versus</i> FL2W) representando a população de células isoladas (vermelho) e de <i>doublets</i> celulares (azul).....	35
Figura 7	- Esquema ilustrativo do ciclo de amplificação, hibridização e aquisição de imagens.....	37
Figura 8	- Eletroferograma (do Agilent <i>Bioanalyzer</i> 2100) representando uma amostra com alta qualidade de RNA total.....	40
Figura 9	- Eletroferograma representativo de uma amostra de cRNA marcada com biotina e purificada após um ciclo de amplificação.....	44
Figura 10	- Eletroferograma representando uma amostra de cRNA fragmentada.....	45
Figura 11	- Imagens da hibridização do Oligo B2 obtidas pelo <i>Scanner 3000</i>	47
Figura 12	- Desenho representativo da variação do valor de R em função da intensidade de sinal das sondas MM.....	49
Figura 13	- Esquema representativo das análises do perfil de expressão gênica.....	51
Figura 14	- Modelo matemático para quantificação relativa em RT-PCR em tempo real (Pfaffl 2001).....	60
Figura 15	- Caracterização das populações celulares das amostras 08.FAC, 09.FAC, 10.FAC, 11.FAC e 12.FAC.....	70
Figura 16	- Reações de imunofluorescência para verificação da presença de receptores de vitamina D nas amostras 08.FAC, 09.FAC, 10.FAC, 11.FAC e 12.FAC.....	73
Figura 17	- Efeitos da VD ₃ sobre a distribuição do ciclo celular das amostras de FACs.....	75
Figura 18	- Análise da integridade do RNA total purificado pelo	

	aparelho <i>Bioanalyzer</i>	79
Figura 19	- Análise da integridade do RNA amplificado e purificado realizada no aparelho <i>Bioanalyzer</i>	81
Figura 20	- Análise da fragmentação do RNA realizada no aparelho <i>Bioanalyzer</i>	82
Figura 21	- Intensidades de PM em log2 das amostras tratadas com VD ₃	89
Figura 22	- Diagrama de Vein demonstrando a intersecção dos genes diferentemente expressos (GDE) resultantes dos dois grupos de tratamento com VD ₃	92
Figura 23	- Representação gráfica da classificação dos genes provenientes do Grupo I em processos biológicos realizada pela ferramenta <i>ToppGene</i>	94
Figura 24	- Classificação dos genes provenientes do Grupo I em processos biológicos realizada pelo <i>GOTM</i>	95
Figura 25	- Representação gráfica da classificação dos genes provenientes do Grupo II e induzidos pela ação da VD ₃ em processos biológicos realizada pela ferramenta <i>ToppGene</i>	96
Figura 26	- Classificação dos genes provenientes do Grupo II e induzidos pela ação da VD ₃ em processos biológicos realizada pelo <i>GOTM</i>	98
Figura 27	- Representação gráfica da classificação dos genes provenientes do Grupo II e inibidos pela ação da VD ₃ realizada pela ferramenta <i>ToppGene</i>	99
Figura 28	- Classificação dos genes provenientes do Grupo II e inibidos pela ação da VD ₃ em processos biológicos realizada pelo <i>GOTM</i>	100
Figura 29	- Expressão relativa dos genes avaliados por RT-PCR em tempo real nas amostras controles e tratadas com VD ₃	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Apresentação das amostras utilizadas no estudo.....	28
Tabela 2	- <i>Status</i> das amostras.....	65
Tabela 3	- Valores de concentração e relação 260/280 do RNA total obtidos por espectrofotometria.....	76
Tabela 4	- Valores de RNA total obtidos após etapa de purificação.....	77
Tabela 5	- Valores de cRNA total obtidos após amplificação e purificação de RNA.....	80
Tabela 6	- Valores de <i>background</i> , ruído e porcentagem de <i>probes</i> presentes nos <i>arrays</i> hibridizados.....	83
Tabela 7	- Razão 3'/5' dos controles externos de amplificação.....	85
Tabela 8	- Razão 3'/5' dos controles de hibridização.....	86
Tabela 9	- Genes selecionados como candidatos a validação.....	102
Tabela 10	- Valores de expressão relativa das amostras para cada um dos genes provenientes do Grupo I.....	109
Tabela 11	- Valores de expressão relativa das amostras para cada um dos genes provenientes do Grupo II.....	110
Tabela 12	- Teste de normalidade de Shapiro-Wilk.....	112
Tabela 13	- Correlação entre os dados obtidos pelas metodologias de <i>microarray</i> e RT-PCR em tempo real dos genes provenientes do Grupo I.....	116
Tabela 14	- Correlação entre os dados obtidos pelas metodologias de <i>microarray</i> e RT-PCR em tempo real dos genes provenientes do Grupo II.....	117

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Valores padronizados de anticorpos primários utilizados nos ensaios de caracterização.....	68
Quadro 2 - Apresentação dos genes pertencentes às vias de anti-apoptose, migração celular e adesão celular, segundo a ferramenta <i>ToppGene</i>	103
Quadro 3 - Classificação em vias dos genes alterados pelo tratamento com 100nM de vitamina D ₃	104
Quadro 4 - Características dos iniciadores já existentes no laboratório.....	105
Quadro 5 - Características dos iniciadores desenhados.....	105
Quadro 6 - Valores de eficiência dos iniciadores.....	107

RESUMO

Campos, LT. *Perfil de expressão gênica de fibroblastos associados ao câncer de mama submetidos ao tratamento com vitamina D* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

O Papel da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (VD_3) ou calcitriol, o metabolito ativo da Vitamina D, em câncer de mama tem sido extremamente explorado. Os efeitos antiproliferativos, prodiferenciativos e antiinflamatórios da VD_3 são bem documentados na literatura. Análises de *microarray* vêm auxiliando a identificação de vários genes responsivos e modulados pela VD_3 e seus análogos. A maioria desses genes apresentados na literatura é proveniente de estudos utilizando linhagens celulares de câncer de mama ou modelos animais. Pouco é sabido sobre a ação da VD_3 em outros tipos celulares constituintes do microambiente tumoral. Fibroblasto associado ao câncer (FAC), o principal componente do microambiente tumoral, apresenta um papel central no complexo processo de interação entre tumor e estroma e consequentemente em todos os passos envolvidos na tumorigênese. O objetivo do nosso estudo foi identificar genes chaves regulados pela VD_3 em fibroblastos associados ao câncer de mama. Para isso, culturas primárias de fibroblastos provenientes de cinco amostras de carcinoma mamário ductal invasivo foram estabelecidas e posteriormente caracterizadas fenotipicamente por um conjunto de marcadores. Após a confirmação da presença de receptor de vitamina D, os fibroblastos de cada amostra foram divididos em três grupos: um grupo controle e grupos de tratamento com 0,5 nM e 100 nM de VD_3 durante 24 horas. A determinação do perfil de expressão gênica foi realizado utilizando tecnologia de oligo *microarray* com o GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix). Foram obtidos 274 genes diferentemente expressos entre os grupos controle e tratamento com 0,5 nM de VD_3 , muitos deles envolvidos em processos como apoptose e migração celular. Os 161 genes diferentemente expressos obtidos a partir da comparação entre grupos controle e tratamento com 100 nM de VD_3 apresentaram-se funcionalmente envolvidos em diversos processos biológicos, sendo que os mais significativos processos regulados pela VD_3 em fibroblastos associados ao câncer de mama foram respostas inflamatória e imune, sugerindo que a ação antiinflamatória da VD_3 , anteriormente relatada em estudos utilizando células epiteliais de câncer de mama, pode também ser aplicada a fibroblastos associados ao câncer de mama.

Descritores: calcitriol, fibroblastos, neoplasias da mama, perfilação da expressão gênica, análise de sequência com série de oligonucleotídeos

SUMMARY

Campos, LT. *Gene expression profiling of breast carcinoma associated fibroblast following treatment with vitamin D* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010.

The role of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (calcitriol), the active metabolite of Vitamin D, in breast cancer has been extremely explored. Antiproliferative, prodifferentiating and anti-inflammatory effects of calcitriol have been reported in breast cancer. Expression profile by microarray analysis has identified many responsive genes modulated by calcitriol and analogs. The majority of them defined to date are based on studies using breast cancer cell lines or mouse models. Little is known about the action of calcitriol in the others cell types present into the tumor microenvironment. Cancer-associated fibroblasts (CAFs), the principal cell component of the tumor microenvironment, play a central role in the complex process of tumour–stroma interaction and consequently in all breast cancer tumorigenesis steps. The aim of our study was to identify key genes that are regulated by calcitriol in breast cancer associated fibroblasts. Primary fibroblasts cell cultures from five breast cancer samples were established and then phenotyping characterized by a set of markers. The occurrence of vitamin D receptor was confirmed in all samples and fibroblasts were divided in three groups: one control group and two treatment groups, 0.5 nM and 100 nM of calcitriol during 24 hours. The determination of gene expression profile was performed by oligo microarray technology using the GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix). Control and 0.5 nM calcitriol analysis resulted in 274 differentially expressed genes, many of them involved in biological processes as apoptosis and cell migration. The 161 differentially expressed genes obtained from comparison between groups control and 100 nM calcitriol treatment were functionally involved in several biological processes. The most significant processes regulated by VD_3 in breast CAFs were the inflammatory and immune responses, suggesting that the anti-inflammatory action of calcitriol, yet reported in several studies using epithelial breast cancer cells, may also be applied to breast cancer associated fibroblasts.

Descriptors: calcitriol, fibroblasts, breast neoplasms, gene expression profiling, oligonucleotide array sequence analysis

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Mama

O câncer de mama é um problema de saúde pública no mundo todo, sendo o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o primeiro entre as mulheres. A cada ano cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama.

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61%, sendo que em países desenvolvidos essa sobrevida aumenta para 73%, e nos países em desenvolvimento diminui para 57% [1].

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, Ministério da Saúde) o número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2010 será de 49.240, com risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres [1].

Histologicamente o câncer de mama pode se apresentar sob a forma de carcinoma *in situ* e invasivo, e em 90% dos casos pertence aos carcinomas que se originam das células luminais do epitélio dos lóbulos e ductos da glândula mamária. Os carcinomas lobular *in situ* (cuja sigla do inglês é *LCIS*) e ductal *in situ* (*DCIS*) são o resultado de uma proliferação

anormal de células neoplásicas confinada aos lóbulos ou ductos, respectivamente. Já nos carcinomas lobular invasivo (*ILC*) e ductal invasivo (*IDC*) as células rompem a membrana basal do epitélio lobular e ductal, respectivamente, invadindo tecidos adjacentes e penetrando no endotélio de vasos sanguíneos e/ou linfáticos.

O estadiamento do câncer de mama é baseado no sistema de classificação TNM, que é o método mais utilizado para a classificação de tumores malignos e a descrição de sua extensão anatômica. Esse sistema foi criado pela UICC (*Union Internationale contre le Cancer*) e pelo AJCC (*The American Joint Committee on Cancer*) e está baseado tanto em evidências anteriores ao tratamento, obtidas normalmente pelo exame físico e diagnóstico por imagem, caracterizando o cTNM, quanto em evidências após o tratamento cirúrgico- pTNM, sendo evidenciado pelo exame histopatológico do espécime cirúrgico e dos linfonodos, para detectar a presença ou ausência de metástases em linfonodos regionais. O sistema TNM de classificação considera a extensão do tumor primário (T), presença e extensão de metastases em linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M). O tamanho do tumor e a presença de metástases linfonodais são os mais significantes fatores de risco para a recorrência do câncer de mama e para a piora da sobrevida global [2]. O grau histológico tem como base a combinação de parâmetros como a razão de índice mitótico, grau nuclear e arranjo do tumor. De acordo com a intensidade de cada parâmetro (discreta, moderada ou elevada) são atribuídas pontuações (1 a 3). Assim, a soma dos três parâmetros fornece

um determinado valor (*escore*) que corresponde ao grau histológico, sendo grau 1: escore 3-5, grau 2: escore 6 ou 7 e grau 3: escore 8 ou 9, de acordo com *Scarff-Bloom-Richardson* (SBR) [3,4].

Vários fatores de risco relacionados com o desenvolvimento do câncer de mama estão sendo identificados e quantificados. Alguns deles são citados abaixo [5].

- História familiar de câncer de mama, principalmente devido às mutações nos genes BRCA1 e BRCA2. Comparada com mulheres que não apresentam parentes afetados, mulheres com um parente de primeiro grau afetado apresentam duas vezes o risco de câncer de mama.

- Fatores hormonais e reprodutivos de risco: exposição ao estrógeno endógeno (menarca precoce (idade < 12 anos) e menopausa tardia (idade > 55 anos)), uso de pílula anticoncepcional e uso de terapia de reposição hormonal são associados a aumento do risco de desenvolver câncer de mama. Quanto mais cedo ocorrer a primeira gestação, menor será o risco de câncer de mama. E a amamentação parece estar associada com a redução do risco de câncer de mama.

- Densidade mamográfica, ou seja, proporção do tecido mamário que aparece denso no exame de mamografia. O risco de câncer de mama aumenta com o aumento da densidade mamográfica do seio.

- Doenças mamárias proliferativas benignas. Certos tipos de doenças mamárias benignas (tais como carcinoma lobular *in situ*) estão associados com aumento do risco de câncer de mama.

- Estilo de vida (obesidade, etilismo, tabagismo, sedentarismo).

- Fatores ambientais (exposição aos carcinógenos).
- Mais recentemente, tem sido grande a atenção dada à ligação entre deficiência de vitamina D e risco de desenvolvimento de câncer de mama.

1.2. Vitamina D

O termo “vitamina D” (VD) refere-se a um grupo de hormônios esteroídicos, assim como os metabólitos dessas substâncias. As duas formas principais de VD são vitamina D₃ (VD₃) ou colecalciferol (ocorre em humanos e animais) e vitamina D₂ ou ergocalciferol (ocorre em plantas) [6]. Poucos alimentos contêm naturalmente VD, sendo que a síntese cutânea de vitamina D₃ é normalmente responsável por cerca de 90% da nossa VD necessária [7].

A VD, produzida na pele pela ação dos raios ultravioletas B (comprimento de onda entre 290-315 nm) ou ingerida via dieta, é biologicamente inativa e requer uma hidroxilação obrigatória pela enzima 25-hidroxilase no fígado para 25-hidroxivitamina D₃ e, posteriormente, nos rins é convertida para 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃ (1 α ,25(OH)₂D₃ ou VD₃) pela enzima 1 α -hidroxilase. A 25-hidroxivitamina D₃ é a principal forma circulante sendo o principal indicador do estado corpóreo de vitamina D enquanto a 1 α ,25(OH)₂D₃, também denominada calcitriol, é a forma biologicamente ativa ou forma hormonal. O catabolismo se dá através da ação da enzima 24-hidroxilase, cuja abundância é controlada pela própria VD₃, criando-se assim

um mecanismo de retro-controle em que a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induz a síntese da enzima, dando origem a metabólitos menos ativos, reduzindo os níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (figura 1) [8].

Figura 1. Metabolismo da Vitamina D. A síntese fotoquímica da vitamina D_3 (colecalfiferol, D_3) ocorre cutaneamente onde a pró-vitamina D_3 (7-dihidrocolesterol) é convertida em pré-vitamina D_3 em resposta à exposição à radiação ultravioleta B (luz solar). Vitamina D_3 , obtido da isomerização da pré-vitamina D_3 nas camadas epidérmicas basais ou da absorção intestinal de comida natural e comidas fortificadas e suplementos, liga-se à proteína de ligação à vitamina D (*DBP*) na circulação sangüínea, e é transportada ao fígado. D_3 é hidroxilizada no fígado pelas 25-hidroxilases (25-OHase), resultando em 25-hidroxicolecalciferol ($25(\text{OH})\text{D}_3$) que é 1- α -hidrolisada no rim pela 25-hidroxivitamina D_3 -1- α -hidroxilase (1- α -OHase). Produzindo assim o esteróide ativo $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (calcitriol), que apresenta diferentes efeitos em vários tecidos alvos. Os principais efeitos da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em vários tecidos alvos estão citados acima.

A síntese de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a partir de $25(\text{OH})\text{D}_3$ é estimulada pelo hormônio da paratireóide (PTH) e suprimida por Ca^{2+} (cálcio), P_i (fósforo) e

pela própria $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. O passo restritivo de tarifa do catabolismo é a degradação de $25(\text{OH})\text{D}_3$ e $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a $24,25(\text{OH})\text{D}_3$ e $1\alpha,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, respectivamente, que ocorre devido à 24-hidroilação da enzima 25-hidroxivitamina D 24-hidroxilase (24-OHase), codificada pelo gene CYP24A1. $24,25(\text{OH})\text{D}_3$ e $1\alpha,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ são então excretados [8].

A VD_3 controla o metabolismo de cálcio e fósforo para o desenvolvimento normal e mineralização do esqueleto saudável, além de regular a expressão de diversos genes. Sua forma ativa atua no núcleo celular (regulação gênica) e na membrana celular (resposta rápida) em mais de 30 tecidos e órgãos agindo em mais de 200 genes. Exemplos de ação de resposta rápida da VD_3 incluem a promoção da absorção intestinal de cálcio, a secreção de insulina e a migração rápida de células endoteliais [9].

A regulação gênica desempenhada pela VD_3 decorre da sua interação com os receptores de vitamina D (VDR). Hormônios esteroídicos e retinóides, sendo lipofílicos, são transportados por proteínas carreadoras no sangue. Após dissociação destes carreadores, tais hormônios se difundem pela membrana celular e se ligam a receptores específicos no citosol ou núcleo [10]. Um dos membros da superfamília de receptores nucleares é o receptor de vitamina D, o qual media o efeito regulatório da VD_3 e cuja expressão já foi descrita em células tumorais mamárias [11].

Um pré-requisito essencial para a modulação direta via VD_3 é a localização de VDR próximo à maquinaria de transcrição basal. Isto ocorre pela ligação do VDR ao elemento de resposta ao receptor de vitamina D (VDRE) de um gene responsivo à VD_3 . O domínio de ligação ao DNA (DBD)

do VDR entra em contato com uma sequência hexamérica de DNA, ou seja, uma sequência padrão de seis nucleotídeos específicos que apresentam uma região consenso com o domínio de ligação do receptor. Para a ligação de um complexo estável DNA-proteína, deve haver a formação de homo ou heterodímeros com outro receptor nuclear a fim de que ocorra uma ligação eficiente ao DNA. Os VDREs simples são formados por duas sequências padrão de seis nucleotídeos, separadas por três nucleotídeos. Na maior parte dos casos, o receptor que participa do heterodímero é o receptor de ácido retinóico (RXR) [12, 13]. Sendo assim, o complexo receptor-hormônio atuará no DNA nuclear a fim de alterar a transcrição de genes responsivos à VD_3 (Figura 2).

Fonte: Dusso S. A. (2003) [13].

Figura 2. Ativação do VDR. O diagrama mostra os passos envolvidos na regulação transcricional da $1,25(OH)_2D_3$: Ligação do ligante ao receptor de vitamina D (VDR); heterodimerização do VDR com o receptor de ácido retinóico (RXR); ligação do complexo VDR/RXR ao elemento de resposta à VD (VDRE); recrutamento dos componentes do complexo RNA polimerase II (Pol II), incluindo interações diretas com co-reguladores (CoReg) e com fator transcrricional IIB (B).

Um crescente número de estudos sugere que a VD_3 pode proteger contra alguns tipos de câncer, incluindo câncer de mama. Estudos

prospectivos demonstraram que as taxas de morte decorrente do câncer de mama tende a ser maior em áreas com baixos índices de luz solar e menor em áreas ensolaradas [14 - 16] e também que mulheres expostas regularmente à luz solar e com consumo de vitamina D acima da média apresentam baixa significativa nas taxas de câncer de mama [17]. A maioria dos estudos epidemiológicos demonstra que altos níveis séricos de 25(OH)D estão associados com baixas taxas de incidência de vários cânceres. Mulheres que apresentaram maior exposição à luz solar UVB no estudo NHANES III (*Third National Health and Nutrition Examination Survey*) tiveram apenas metade da incidência de câncer de mama em comparação com aquelas cuja exposição à luz UVB foi menor (risco relativo 0,50, 95% CI=0.29 – 0.86) [18].

Um estudo de meta-análise recente incluiu dados provenientes de onze estudos sobre VD ingerida, sete estudos sobre os níveis de 25(OH)D circulantes, três estudos sobre os níveis de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ circulantes e quinze estudos sobre ingestão de cálcio, todos associados com risco de câncer de mama [19]. As análises demonstraram uma significativa relação inversa entre vitamina D ingerida e o risco de câncer de mama, com um risco relativo absoluto (RR) para câncer de mama do alto consumo de VD em relação ao baixo consumo de 0,91 (95% CI=0,85-0,97). Foi também encontrada associação entre o mais alto quartil de 25(OH)D circulante com 45% (OR=0,55, 95% CI=0,38-0,80) de diminuição de câncer de mama quando comparado com o mais baixo quartil. A mesma comparação entre quartis em relação ao cálcio demonstrou diminuição de 19% (RR=0,81, 95%

CI=0,72-0,90) do risco de câncer de mama. Não foi encontrada associação significativa entre níveis de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ circulantes e câncer de mama. Assim, esses resultados apresentam fortes evidências que a vitamina D e também o cálcio possuem efeito quimiopreventivo contra o câncer de mama.

Muitos trabalhos têm contribuído para elucidar o mecanismo de ação da VD e de seus metabólitos na redução da incidência de câncer. O que eles vêm demonstrando é que, através de sua via genômica, a VD_3 pode modular a expressão de genes de uma maneira tecido-específica, levando principalmente à inibição da angiogênese tumoral [20] e da proliferação celular, à indução da diferenciação celular e à promoção da apoptose [21, 22].

Stumpf *et al* [23], em 1979, relatou que o VDR está presente em quase todos os tecidos do corpo. Suda *et al* (1982) [24] primeiramente notou que VD_3 causou uma marcante inibição do crescimento celular em células M-1 leucêmicas VDR-positivas. No mesmo ano, Tanaka *et al* [25] demonstrou que $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ apresentava o mesmo em células leucêmicas HL-60 que possuíam o VDR.

Diversos autores estudaram o efeito antiproliferativo da VD_3 sobre linhagens mamárias normais e tumorais. Hager *et al* (2001) observaram a parada do ciclo celular em G0/G1 pelo aumento de p21 e p27 em linhagens de células escamosas de câncer de cabeça e pescoço após tratamento com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [26]. Moffatt *et al* (2001) propuseram um modelo no qual a redução da proliferação é mediada pela elevação de p21 em linhagens de células tumorais prostáticas [27]. A linhagem SC-3, oriunda de carcinoma

mamário murino, apresentou inibição do crescimento mediado por VD₃ mesmo quando estimulada por fator de crescimento andrógeno [28].

No entanto, alguns genes que são transcricionalmente afetados pela VD₃ não possuem VDREs em suas regiões promotoras, sugerindo que a VD₃ apresenta efeitos indiretos na regulação do ciclo celular utilizando outra via de sinalização [19]. Costa *et al* (2009) [29] constataram ação antiproliferativa da VD₃ em células MCF-7 nas quais os VDRs foram silenciados, demonstrando assim que o efeito da vitamina D não decorreu da ação da sua via clássica.

Em várias células neoplásicas, a VD₃ também induz diferenciação resultando na geração de células com fenótipos menos malignos [30]. Uma análise de *microarray* de células de carcinoma de células escamosas tratadas com um análogo da vitamina D demonstrou que o tratamento suprimiu a expressão de marcadores de progressão do câncer (N-caderina, antígeno de carcinoma de células escamosas, tenascina-C e antígeno tumoral L6) e induziu a expressão de genes associados à diferenciação epitelial (protease M, colágeno tipo 13 e desmogleina) [31, 32]. Os mecanismos envolvidos neste processo são específicos para cada tipo celular e contexto, e incluem, por exemplo, a regulação da via de sinalização envolvendo β -catenina, Jun-N-terminal quinase (JNK), fosfatidil inositol 3-quinase (PI-3k) e fator nuclear κ B (NF κ B), assim como a regulação da atividade de inúmeros fatores de transcrição como o complexo ativador de proteína-1 (AP-1) e proteína de ligação de CCAAT (C/EBP) [33].

Indução do apoptose é outro importante papel da VD_3 na inibição do crescimento tumoral. Em muitos tipos celulares, a VD_3 altera o conteúdo de várias proteínas da família bcl-2 reguladora de apoptose. VD_3 afeta os níveis de proteínas pró-apoptóticas (bax, bak) e/ou anti-apoptóticas (bcl-2, bcl-XL), pendendo o equilíbrio em direção a apoptose, e não à sobrevivência celular [34]. Em algumas células a VD_3 também ativa diretamente caspases para induzir a apoptose [35, 36].

Inibição da angiogênese é também uma importante função atribuída à vitamina D, pois esta pode reprimir o crescimento de células endoteliais *in vitro* e reduzir a angiogênese *in vivo* [19].

Krishnan *et al* (2007) sugerem que a VD_3 exibe ações antiinflamatórias que podem contribuir para a inibição dos efeitos do câncer de próstata [37]. Eles descobriram que a $1,25(OH)_2D_3$ inibe a síntese e as ações de prostaglandinas pró-inflamatórias (PGs) através de três mecanismos: (1) inibição da expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima que sintetiza PGs, (2) indução da expressão de 15-prostaglandina dehidrogenase (15-PGDH), que inativa PGs, e (3) diminuição da expressão de receptores de prostaglandinas E e F, que são mediadores da sinalização de PG.

Amplas evidências indicam que a VD_3 apresenta atividades antiproliferativa, pró-diferenciativa, apoptótica e antiangiogênica nos mais diferentes tipos de células epiteliais cancerosas, porém pouco se sabe sobre sua influência nos diversos constituintes do estroma tumoral. Somando-se ainda o fato de que dentro de um mesmo tecido, diferentes tipos celulares

podem exibir respostas heterogenias à adição de VD_3 [19], é possível concluir que a realização de estudos com o objetivo de elucidar os mecanismos de ação, assim como as vias moleculares envolvidas na resposta estromal à adição de VD_3 são necessários para possibilitar completa compreensão da ação que da VD_3 nos mais variados tipos de cânceres.

1.3. Estroma tumoral e câncer

Ao longo do tempo, a carcinogênese foi caracterizada como um processo de múltiplos passos, resultado de uma série de alterações genéticas que ocorreram em sequência. Durante esse processo, as células cancerosas acumulam múltiplas e consecutivas alterações genéticas, além de perderem o controle sobre seu crescimento [38, 39].

Esse modelo de carcinogênese centrado na célula cancerosa e no genoma permite a identificação e caracterização de vários oncogenes e genes supressores tumorais, porém ignora a heterogeneidade e a complexidade estrutural do câncer [40]. Assim, o modelo historicamente prevalente de progressão tumoral focada apenas na célula epitelial tumoral tem sido substituído, em diversos estudos recentes, por um modelo que destaca a importância do papel que o microambiente desempenha na evolução e na progressão tumoral [41].

Tumores são órgãos complexos compostos não só por células neoplásicas, mas também por células estromais associadas ao câncer e por

componente estromal, que inclui componentes de matriz, quimiocinas e citocinas, todos contribuindo para a complexidade do microambiente tumoral [40, 42]. Por essa razão, a progressão tumoral passou recentemente a ser reconhecida como resultado da interação entre os diferentes tipos celulares presentes no tumor e o tecido que o envolve (estroma tumoral) (figura 3), e o estroma tumoral foi admitido como sendo um importante regulador do comportamento da célula epitelial, ao invés de um simples suporte estrutural [43].

Fonte: Mueller, Fusening (2004) [39].

Figura 3. Progressão tumoral. (A) Epitélio normal, bem-diferenciado e estratificado é separado do componente estromal pela membrana basal. (B) Durante a transição para displasia pré-maligna, a diferenciação das células epiteliais é interrompida, a membrana basal se mantém intacta, fibroblastos tornam-se ativados, e ocorre aumento no número de macrófagos. (C) A progressão para o carcinoma é associada à proliferação das células epiteliais e à ativação do estroma tumoral. Aumenta o número de células inflamatórias e os fibroblastos apresentam-se diferenciados em miofibroblastos.

O estroma tumoral apresenta uma constituição diferente da encontrada no estroma normal. É composto por grandes quantidades de

tecido conjuntivo (provavelmente devido ao aumento na secreção de fatores do crescimento), o que pode afetar o comportamento da célula epitelial tanto por mecanismos mecânicos (devido à compactação do tecido estromal), como bioquímicos (devido à sinalização alterada). Consiste também de matriz extracelular (MEC ou ECM, do inglês *extracellular matrix*), células mesenquimais (como fibroblastos e adipócitos), vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células inflamatórias e imunes. Em inúmeros tipos de neoplasias, como tumores de mama, colón, estômago e pâncreas, o componente estromal representa a maior parte da massa tumoral, sendo que em alguns casos, este constitui mais de 90% da massa do tumor [44].

Células cancerosas podem alterar seu componente estromal adjacente para formar um ambiente que possibilita e suporta a progressão tumoral. Esse estroma tumoral “reativo” foi denominado desmoplasia [39], e é um aspecto comum de muitos tumores sólidos, incluindo tumores de mama, próstata, cólon, pulmão e útero [45, 46], sendo esta responsável pela consistência densa característica desses tumores. A desmoplasia caracteriza-se pela ocorrência do processo de angiogênese e pela presença de matriz extracelular específica (apresenta quantidades aumentadas de certos colágenos, fibronectinas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas), de infiltrado de células inflamatórias e imunes e de fibroblastos ativados, que são seus principais constituintes [47 - 49].

Tem-se demonstrado a influência do microambiente estromal em inúmeros estágios da tumorigênese, incluindo iniciação, crescimento tumoral, invasão local e metástase.

Barcelos-Hoff, Ravani, 2000, demonstraram que a irradiação do componente estromal da glândula mamária *in vivo* contribui para a formação de tumores epiteliais [50]. A formação do carcinoma desde seus estágios precoces parece depender também da habilidade de células epiteliais transformadas em recrutar e subverter uma variedade de células estromais originárias do tecido normal adjacente. Assim, o componente estromal pode desenvolver-se conjuntamente com o compartimento epitelial tumoral, contribuindo assim com os efeitos progressivos da doença [44, 50, 51].

Em um estudo com modelos xenográficos com células mamárias metastáticas MDA-MB 231 relatou-se a presença de atividade enzimática derivada do estroma, diferente daquela encontrada no carcinoma, associada ao crescimento tumoral, indicando a contribuição do microambiente para o desenvolvimento do tumor [52].

Os mecanismos pelos quais as interações célula-MEC influenciam o comportamento metastático das células tumorais são variados e incluem: (a) mudanças na composição glicoprotéica, que podem alterar a adesão celular e a motilidade; (b) aumento de proteases MEC-degradantes no componente estromal, o que facilita o movimento das células tumorigênicas pela degradação da membrana basal e barreiras estromais; e (c) liberação de fragmentos da MEC ativos e/ou fatores de crescimento que promovem progressão da célula tumoral [53].

A interação entre o componente estromal e o tumor pode também determinar se o tumor irá ou não se estabelecer e progredir. Por exemplo, um estudo de Kuperwasser *et al* demonstrou que o estabelecimento de

tumores de mama xenográficos humanos em camundongos depende da presença de fibroblastos estromais derivados do tumor humano [54].

1.3.1 Fibroblastos associados ao tumor

Os fibroblastos foram primeiramente descritos no final do século XIX, baseados na sua localização e sua aparência microscópica [55 - 57]. São células não-vasculares, não-epiteliais e não-inflamatórias do tecido conjuntivo e seu principal componente. Eles estão mergulhados na matriz fibrilar do tecido conjuntivo, e são, em grande parte, responsáveis pela sua síntese [57].

As funções dos fibroblastos incluem: composição da matriz extracelular (devido à produção de colágenos do tipo I, III e V e fibronectina), regulação da diferenciação do epitélio, regulação da inflamação e envolvimento no processo de cicatrização de feridas [58, 59]. Eles também contribuem para a formação das membranas basais, pois secretam lamininas (I e V) e colágeno do tipo IV, são fontes importantes de proteases degradantes da MEC [60, 61], além de serem imprescindíveis para manter a homeostasia do tecido epitelial adjacente através da secreção de fatores de crescimento e através da interação direta com a célula epitelial [62]. Como os diferentes órgãos do corpo requerem padrões específicos, os fibroblastos provenientes de cada órgão apresentam variações órgão-específicas nas classes de moléculas biologicamente ativas que eles expressam [63].

Um fibroblasto normal pode adquirir uma forma “ativada” (figura 4), que apresenta um importante papel na modulação da resposta imune durante o processo de cicatrização tecidual devido à secreção de citocinas (como a interleucina-1) e de quimiocinas [64]. Essa ativação é induzida por vários fatores de crescimento (TGF β , EGF, PDGF e FGF2) liberados pelas células epiteliais danificadas ou pelas células do infiltrado mononuclear (monócitos e macrófagos) após ocorrer injúria tecidual. Além disso, fibroblastos são também ativados pela comunicação direta célula-célula e por contatos com leucócitos mediados por moléculas de adesão, e também através de espécies reativas de oxigênio, fatores do sistema complemento e composição alterado da MEC [54, 57, 65].

Fonte: Kalluri, Zeisberg (2006) [57].

Figura 4. Ativação do fibroblasto.

Os fibroblastos “ativados” são as células estromais predominantes no tumor [51], sendo denominados miofibroblastos, fibroblastos peritumorais, células estromais reativas ou fibroblastos associados ao carcinoma (FACs) quando se encontram associados a células cancerosas. São definidos

imunohistologicamente pela expressão de actina de músculo liso tipo α e de vimentina. Quando comparados aos fibroblastos normais, os fibroblastos “ativados” apresentam elevada taxa de proliferação, expressão de diferentes proteínas da MEC e expressão aumentada de fatores do crescimento [49, 63].

FACs frequentemente representam a maioria das células do estroma tumoral de vários tipos de carcinomas humanos. Em carcinomas de mama, em torno de 80% dos fibroblastos estromais adquirem esse fenótipo ativado [40,57].

Estudos recentes estão começando a elucidar o papel estrutural e funcional que os fibroblastos desempenham tanto no desenvolvimento quanto na progressão do câncer. A contribuição específica dessas células ainda é pouco compreendida, porém seu papel nas diversas etapas do processo da carcinogênese é muito bem aceito e comprovado em vários estudos.

Trabalhos recentes têm demonstrado que FACs extraídos de carcinomas invasivos humanos de mama são mais competentes em promover o crescimento das células mamárias cancerosas e em aumentar a angiogênese no tumor quando comparados às células presentes fora da massa do tumor [66].

A progressão do tumor induzida por FACs foi demonstrada em um estudo de Tlsty e Cunha (1999) onde FACs extraídos de carcinomas humanos de próstata foram comparados com fibroblastos isolados de tecido prostático não-carcinogênico [67]. Os pesquisadores prepararam uma

mistura contendo FACs e células epiteliais prostáticas humanas não-tumorigênicas e iniciadas, que foi injetada em camundongos imunodeficientes. Foi então observado que FACs estimularam o crescimento de massas tumorais de células epiteliais prostáticas não-tumorigênicas, enquanto fibroblastos normais não foram capazes de estimular esse crescimento.

É muito provável que FACs promovam a progressão tumoral através de comunicações específicas com as células cancerosas [51]. Os fibroblastos podem transmitir sinais bi-direcionalmente entre o MEC e as células epiteliais, promovendo mudanças dinâmicas e composicionais no estroma [40].

Fibroblastos podem também influenciar o processo de metástase tumoral. Um estudo demonstrou que somente as células de melanoma que metastisaram sofreram a ação dos fibroblastos, indicando que um estímulo específico desconhecido promovido pelo fibroblasto promoveu o crescimento de células cancerosas em sítios distantes [68].

A angiogênese é outro processo relacionado com o crescimento e progressão tumoral no qual os FACs participam. Os FACs recrutam células epiteliais progenitoras dentro do carcinoma através da secreção de SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*). As células epiteliais progenitoras se organizam em uma estrutura tri-dimensional originando um novo capilar [40].

Tendo em vista os exemplos citados pode-se perceber a importância da interação entre estroma tumoral e células cancerosas, assim como o

papel fundamental que este estromal exerce nas diversas etapas da tumorigênese.

Sendo assim, tanto o fibroblasto quanto o estroma tumoral como um todo podem ser considerados potenciais alvos terapêuticos para o tratamento do câncer. Vantagens desse tratamento incluem o fato de que essas células não são tão geneticamente instáveis como as células cancerosas, e que são menos propícias a desenvolver resistência às drogas [69, 70].

Considerando que os fibroblastos constituem o tipo celular predominante no estroma tumoral e que essas células influenciam em muitos, ou talvez todos os estágios da carcinogênese, nota-se a importância de uma terapia voltada contra os fibroblastos [71, 72].

Proteínas conhecidas como ativadoras de fibroblastos (FAP, da sigla em inglês *fibroblast-activation protein*) aparecem como candidatas promissoras para tratamentos específicos contra FACs. FAP não é expressa por tecidos somáticos maduros, exceto por fibroblastos durante o processo de cicatrização e dentro do estroma tumoral [73]. Um estudo com sibrotuzumab (anticorpo para FAP humano) em paciente com carcinoma colo-retal avançado demonstrou que o anticorpo agiu especificamente no tumor sem a presença de efeitos colaterais [74].

Um exemplo de sucesso da terapia visando o estroma tumoral é a inibição de células inflamatórias e citocinas pelo tratamento com drogas antiinflamatórias não-esteróídeos, que resultou numa diminuição do risco de câncer de cólon e mama [75].

Visar FACs como terapia contra o câncer é um conceito intrigante e promissor, que necessita de maiores estudos, pois os mecanismos que regulam a ativação dos fibroblastos ainda não são completamente compreendidos. Sendo assim, trabalhos estão sendo realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da USP nos quais o microambiente tumoral vem sendo estudado a fim de compreender sua ação na progressão tumoral. Com esse intuito, células derivadas do estroma tumoral foram co-cultivadas com linhagens de carcinoma mamário, e as respectivas modificações no perfil gênico de células epiteliais tumorais e fibroblastos foram detectadas (Projeto FAPESP 04/04607-8) [76].

Uma das possibilidades de controle da progressão tumoral seria a normalização do estroma, já postulada pelo grupo de estudo de Bissel e colaboradores [77] e revisto por Mueller e Fusening [39], bem como a quimioprevenção pelo uso de agentes que controlam a função e o comportamento de células do microambiente. Um destes agentes com função definida na proliferação, diferenciação e apoptose de células mamárias normais e malignas é a vitamina D [78].

Seguindo a linha de pesquisa já estabelecida no Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da USP na qual trabalhos vêm sendo desenvolvidos, tanto em linhagens como em tecidos tumorais mamários, com a finalidade de desvendar e compreender a ação da vitamina D no processo tumorigênico [79 - 81], a proposta do presente trabalho é analisar o perfil de expressão gênica dos fibroblastos associados

ao câncer de mama e submetidos ao tratamento com vitamina D com o objetivo de compreender de forma ampla os eventos moleculares associados à ação da vitamina D nesse tipo celular e analisar o papel que essa interação exerce no desenvolvimento e na progressão tumoral mamária, uma vez que esse tipo celular tem um importante papel na progressão tumoral.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Analisar a variação do padrão de expressão gênica de fibroblastos associados ao câncer de mama submetidos ao tratamento com vitamina D.

2.2. Objetivos Específicos

1. Estabelecer culturas primárias de fibroblastos provenientes de amostras de tecidos tumorais de mama (FAC).
 2. Avaliar a expressão de marcadores celulares utilizados na caracterização de fibroblastos por imunofluorescência.
 3. Determinar a expressão de receptor de vitamina D em FAC por imunofluorescência.
 4. Identificar genes diferentemente expressos entre o grupo controle (FACs sem tratamento) e o grupo tratado com vitamina D utilizando a técnica de oligo *microarray*.
 5. Validar a expressão gênica diferencial por ensaios de RT-PCR em tempo real.
-

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Comitê de Ética

O trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo nº 0848/08) e pela Comissão de Ética do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), de onde os tecidos neoplásicos mamários são provenientes. Os Drs. Eduardo Carneiro Lyra e Cíntia Flores foram responsáveis pela coleta deste material biológico. Todas as pacientes foram devidamente informadas e consultadas e a coleta prosseguiu somente após a concordância destas em participarem do estudo e assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

3.2. Casuística

Foram incluídas neste estudo cinco pacientes pós-menopausadas atendidas no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), com hipótese diagnóstica comprovada por exame histopatológico de carcinoma invasivo da mama, estágio clínico II-III (realizado de acordo com os critérios da AJCC, 6ª edição), não-submetidas à quimioterapia neoadjuvante.

Tabela 1. Apresentação das amostras utilizadas no estudo.

Identificação	Idade	TH	GH
8	66a 5m	CDI	II
9	57a 4m	CDI	II
10	41a 2m	CDI	II
11	49a 5m	CDI	II
12	82a	CDI	III

TH: tipo histológico; GH: grau histológico; CDI: carcinoma ductal invasivo. A idade esta apresentada em anos (a) e em meses (m).

3.3. Cultura primária de fibroblastos humanos

Após remoção cirúrgica, o fragmento de tecido mamário tumoral foi colocado em garrafa de cultura celular estéril contendo meio de cultura *DMEM* (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Gibco BRL) acrescido de antibióticos (100 µg/mL ampicilina e estreptomicina) para transporte do material do centro cirúrgico do IBCC ao nosso laboratório de cultura celular. Primeiramente qualquer sobra de tecido adiposo foi dissecada. Em seguida a amostra foi fragmentada em pedaços menores de tecido (explantes), os quais foram lavados duas vezes com PBS e posteriormente distribuídos em garrafas de cultura celular de 25 cm² contendo meio *DMEM* suplementado com 20% de soro fetal bovino (*SFB*) inativado por calor (Gibco BRL), 100 µg/mL de ampicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B. As garrafas foram mantidas em uma incubadora de umidade controlada a 37 °C em atmosfera constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após o início da migração de fibroblastos dos explantes

(aproximadamente 15 dias), os fragmentos de tecido foram cuidadosamente removidos. Uma vez atingida a confluência total das células na garrafa, os fibroblastos foram tripsinizados e subcultivados em outras garrafas, etapa considerada como primeira passagem da cultura. Para os ensaios foram utilizados fibroblastos entre as terceira e décima passagens.

3.4. Caracterização da cultura primária

Ensaio de imunofluorescência foram realizados para verificar se as células que migraram dos explantes eram de fato fibroblastos. Foram utilizados os anticorpos: anti-vimentina (clone Vim 3b4, Dako), anti- α -actina do músculo liso (clone 1A4, R&D Systems), anti-pan-citoqueratina (clones AE1/AE3, Dako), anti-CD31 (clone JC70A, Dako) e anti-S100A4 (clone A5114, Dako). Foram plaqueadas 3×10^4 células sobre lamínulas de 13 mm em placa de 24 poços. Após 24 horas as células foram gentilmente lavadas com *PBS* (Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 1,37 mM, KCl 27 mM, KH_2PO_4 2 mM) e fixadas em paraformaldeído 4%, por 30 minutos à 4 °C. Feito isso, as células foram permeabilizadas com Triton-X100 0,2% (Sigma), durante cinco minutos. Após três lavagens sucessivas com solução de PBS, as células foram incubadas durante uma hora em solução de *PBS/BSA* 5% (Sigma) para bloquear possíveis ligações inespecíficas, e posteriormente incubadas *overnight* com os anticorpos primários à 4 °C. Foram realizadas três lavagens com *PBS-Tween-20* 0,005% para remoção do excesso de anticorpo primário, e então as células foram incubadas durante 90 minutos

com anticorpo secundário conjugado (Alexa Fluor 488 anti-coelho ou camundongo IgG (Invitrogen), dependendo do animal utilizado para produção do anticorpo primário). Novamente as células foram lavadas com *PBS-Tween-20* 0,005% e incubadas com o marcador nuclear DAPI (Sigma). Finalmente, as células foram novamente lavadas como feito anteriormente, e as lamínulas foram montadas em lâminas e visualizadas no microscópio confocal Zeiss utilizando o software LSM510 Meta (Carl Zeiss).

3.5. Determinação dos receptores de vitamina D

Após a confirmação da cultura primária como sendo de fibroblastos, ensaios de imunofluorescência foram novamente realizados, nesta ocasião para determinação de receptores de vitamina D (VDR). Desta forma, ensaios similares aos de caracterização foram efetuados, porém foram utilizados anticorpos primários anti-VDR (clone 9A7, Affinity Bioreagents) e anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado com fluoresceína (FITC) (Sigma). As lâminas resultantes dos ensaios foram visualizadas utilizando microscópio confocal Zeiss e o software LSM510 Meta (Carl Zeiss).

3.6. Tratamento com vitamina D₃

As culturas primárias de fibroblastos foram cultivadas na presença e ausência de vitamina D por 24 horas. Foram plaqueadas 1×10^4 células em garrafas de cultura celular de 150 cm² e, após atingirem confluência entre

70-80%, o meio foi trocado adicionando-se a VD₃, a qual esta na forma de calcitriol (Calbiochem, cat. N° 679101). O calcitriol foi diluído em etanol 100% de forma que o volume da vitamina não ultrapassasse 0,01% do volume total de meio. As concentrações utilizadas para cada cultura de fibroblastos nos experimentos foram de 0,5 nM (concentração fisiológica aproximada) e 100 nM (concentração farmacológica), sendo que os controles negativos receberam apenas etanol 100%, em volume equivalente ao de calcitriol aplicado nas células tratadas. Em seguida, as células tratadas foram destinadas aos experimentos de Citometria de Fluxo para análise de sua distribuição pelas fases do ciclo celular e de *microarray* para avaliar o perfil genético.

3.7. Citometria de Fluxo

a) Avaliação da viabilidade celular

Após 24 horas de tratamento, o meio de cultura foi retirado por sucção a vácuo e as células foram submetidas a uma lavagem com *PBS-EDTA* (Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 1,37 mM, KCl 27 mM, KH₂PO₄ 2 mM, EDTA 1 mM) durante cerca de 30 segundos. Posteriormente, as células foram removidas pela ação de 0,5% *Trypsin-EDTA 1X* (Gibco). A inativação da ação da tripsina ocorreu pela a adição às células de meio *DMEM* suplementado com 10% *SFB* (Gibco). Após serem homogeneizadas com esse meio, as células em suspensão foram transferidas para tubos de 15 mL para serem centrifugadas por dois minutos a 2000 x g. Após descartar o sobrenadante, o

pellet celular foi ressuspensionado em 10 mL de meio completo. Alíquotas de 10 µL foram utilizadas para avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão por coloração com *Trypan Blue*. Para isso, acrescentou-se 10 µL do corante a cada amostra e a mistura foi aplicada sobre uma câmara de *newbauer*. Foram contadas as células nos quatro campos, considerando-se viáveis apenas as células que não apresentavam coloração azul, ou seja, não incorporaram o corante. Considerou-se a viabilidade adequada para os experimentos de Citometria de Fluxo quando o número de células inviáveis não superou 15% do número total de células viáveis.

b) Fixação das amostras

Após avaliação da viabilidade celular, as células em suspensão foram centrifugadas durante dois minutos a 2000 x g e, após descartar o sobrenadante, foram ressuspensionadas em *PBS*. O *pellet* formado após nova centrifugação (2 minutos a 2000 x g), foi cuidadosamente ressuspensionado para fixação das células em 1 mL de etanol 70% diluído em *PBS*, e transferido para tubos de 1,5 mL em banho de gelo. A seguir, as amostras foram armazenadas a -20 °C para posterior análise por Citometria de Fluxo.

c) Incorporação do iodeto de propídio (PI) e leitura das amostras

As amostras fixadas foram retiradas da temperatura a -20 °C e centrifugadas a 2000 x g durante cinco minutos. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensionadas cuidadosamente em 1 mL de *PBS* e submetidas a uma nova centrifugação (2000 x g por 5 minutos). A

seguir, descartou-se o *PBS* e as células foram ressuspensas em 200 μ L de solução de PI (0,08 mg/mL). Essa solução foi preparada previamente a partir de 5 mL de *PBS* ao qual foram adicionados 5 μ L *Triton-X100* (0,01% v/v), 50 μ L *RNAse A* (2 mg/mL) e 80 μ L de iodeto de propídio (5 mg/mL). As células foram analisadas a uma velocidade de cerca de 100 a 200 céls/segundo em Citometro de Fluxo FACScalibur (GE Health Care) equipado com laser de Argônio de 488 nm.

d) Representação gráfica dos dados

O iodeto de propídio (PI) é um agente que se intercala de forma estequiométrica a cada quatro pares de bases de DNA. Após a incidência do laser sobre a amostra, a excitação do PI leva a uma emissão de fluorescência proporcional ao conteúdo de DNA na célula. Todos os sinais gerados são amplificados e convertidos pelo aparelho em pulsos, permitindo a construção de gráficos de distribuição das células no ciclo celular, conforme mostrados pelo histograma na figura 5.

Figura 5. Histograma representativo da distribuição das células nas fases do ciclo celular após aquisição dos dados por Citometria de Fluxo. G1: número de eventos (células) localizados na fase G0/1; S/G2/M: número de eventos (células) localizados em S/G2/M. FL2A: parâmetro que representa a área do pulso gerado; 2n e 4n: conteúdo de DNA antes e após duplicação, respectivamente.

A velocidade da passagem das células pelo citômetro deve ser mantida em torno de 100 a 200 cél/segundo, com a finalidade de minimizar a passagem de agrupamentos celulares durante a aquisição dos dados. Entretanto, mesmo a velocidades reduzidas, é comum a formação de tais agrupamentos, denominados *doublets* celulares. Os gráficos *dot-plot* permitem a exclusão desses *doublets* a partir da utilização de dois parâmetros: FL2A (área) e FL2W (largura). Como os *doublets* como as células em G2/M emitem a mesma intensidade de fluorescência, mas diferem quanto à duração do pulso gerado, que é proporcional à largura ou à área da partícula, é possível selecionar a região que contém a população de células isoladas. A figura 6 permite a visualização de duas populações celulares distintas: uma formada por células isoladas, e uma formada por *doublets* celulares. A seleção da população de células isoladas permite que

apenas essa população seja considerada pelo histograma FL2A para a análise de fases do ciclo celular.

Figura 6. *Dot-plot* (FL2A versus FL2W) representando a população de células isoladas (vermelho) e de *doublets* celulares (azul). FL2A: parâmetro que representa a área do pulso gerado; FL2W: parâmetro que representa o tempo de duração do pulso.

3.8. Tecnologia do oligo *microarray*

O *chip* de oligo *microarray* utilizado foi o *Human Genome U133 Plus 2.0* (cat n°520019) (Affymetrix). Os *genechips probe arrays* foram construídos utilizando uma tecnologia que combina fotolitografia e química combinatória [82]. O *chip* de oligo *microarray* apresenta cerca de 47.000 transcritos e variantes, dentre os quais 38.500 correspondem a genes humanos bem caracterizados. Cada oligonucleotídeo (*probe*) está localizado em uma região específica denominada *probe cell* a qual contém centenas de milhares a milhões de cópias de um oligonucleotídeo específico (*probe*). Cada transcrito está representado por 11 pares de oligonucleotídeos de 25 mer cada, designados PM (*perfect match*- emparelhamento completo) e MM

(*mismatch*- emparelhamento incompleto). Entre os PM há uma hibridização perfeita e completa entre o oligonucleotídeo (*probe*) e o cRNA alvo, contudo, no MM, há um desapareamento, pois a 13ª base não condiz àquela presente no cRNA alvo. Esta característica do MM aponta para a avaliação das ligações não específicas e *background* dentro do sistema Affymetrix de análise. Por fim, os transcritos estão representando a porção próxima a cauda poli-A do RNAm, pois esta região é mais facilmente convertida em alvo marcado com biotina.

Resumidamente, o RNA total foi extraído pelo protocolo do reagente TRIzol® (Invitrogen). A purificação do RNA total foi realizada de acordo com o kit *RNeasy Mini*, cat. no 74104 (Qiagen). A síntese do RNA amplificado foi realizada com o *One-cycle Target Labeling Kit*, cat. no 900493 (Affymetrix) conforme protocolo do fabricante (Figura 7), bem como a hibridização e aquisição das imagens.

cell scraper (Corning Incorporated) as células foram raspadas e volume das células em TRIzol® foi transferido para três tubos de 1,5mL devidamente identificados. As amostras foram armazenadas a -70 °C até o momento da extração do RNA total.

b) Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada seguindo-se a metodologia TRIzol® (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina) (Invitrogen). As amostras armazenadas a -70 °C foram deixadas durante cerca de 5 minutos à temperatura ambiente para descongelamento. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Nuclear) e as amostras foram homogeneizadas por inversão. Após serem deixadas durante 3 minutos em bancada, foram centrifugadas a 4 °C durante 15 minutos a 12.000 x g. Este procedimento baseia-se na habilidade do RNA em permanecer solúvel na fase constituída por fenol e clorofórmio na presença de isotiocianato de guanidina.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL, onde foram acrescentados 500 µL de isopropanol (mesmo volume do sobrenadante) (Nuclear). As amostras foram homogeneizadas e deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos para iniciar a precipitação. Em seguida, as amostras permaneceram precipitando *overnight* a -20 °C.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 4 °C e 12.000 x g. O sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 1 mL de etanol 75% preparado com água *DEPC* (dietilpirocarbonato, forte inibidor

de ribonucleases) para lavagem e centrifugação por 5 minutos a 7.500 x g a 4 °C. Este processo foi repetido por mais uma vez. O excesso de etanol foi retirado e o restante secou após as amostras serem deixadas a temperatura ambiente durante o tempo necessário.

A ressuspensão do *pellet* foi feita com 30 µL de água *DEPC*. Para facilitar a ressuspensão, os tubos foram deixados em banho seco a 65 °C durante 10 minutos. Em seguida, as amostras foram lidas no espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 UV-Vis*, para a avaliação da qualidade e da concentração das amostras. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a relação entre as absorbâncias nos comprimentos de onda 260/280 nm atingiu valores de 1,8 a 2,0.

c) Purificação do RNA total

A purificação do RNA total foi realizada seguindo recomendações do fabricante do kit *RNeasy Mini* (cat no 74104, Qiagen). Brevemente, em um tubo de 1,5 mL devidamente identificado foram aliquoteadas volumes cujas quantidades de RNA total variaram de 15 µg a 100 µg, sendo o volume completado em 100 µL com Água *RNase Free*. Posteriormente foram adicionados 350 µL de tampão RLT e 250 µL de Etanol Absoluto, e o volume total foi imediatamente transferido para a coluna de purificação (*RNeasy Mini Spin Columns*) inserida em um tubo coletor, ambos os presentes no kit. As amostras foram centrifugadas durante 15 segundos a 8.000 x g e a coluna contendo o RNA total foi transferida para um novo tubo coletor, onde foram adicionados 500 µL de RPE e realizada uma nova etapa de centrifugação

durante 15 segundos a 8.000 x g. Em seguida foram adicionados mais 500 µL de RPE e então as amostras foram centrifugadas durante 2 minutos a 8.000 x g. A coluna foi transferida para um novo tubo, adicionou-se 25 µL de água *RNase Free* no centro da coluna e centrifugou-se durante 1 minuto a 8.000 x g para eluir o RNA aderido à coluna.

A integridade do RNA foi avaliada com base no valor do *RIN* (*RNA Integrity Number*), gerado pelo software do aparelho *Agilent Bioanalyzer* (Modelo 2100). A figura 8 demonstra um eletroferograma resultante de uma análise do *Bioanalyzer* utilizando RNA total da linhagem celular HeLa de alta qualidade. Pode-se observar a presença de dois picos correspondentes as RNAs ribossomais 18S e 28S e a qualidade das amostras é dada pelo *RIN*, variando de 0 a 10 em ordem crescente de integridade. O valor mínimo que foi adotado pelo estudo foi 7,0.

Fonte: GeneChip® Expression Analysis Technical Manual. Rev 3 [82].

Figura 8. Eletroferograma (do Agilent *Bioanalyzer* 2100) representando uma amostra com alta qualidade de RNA total. Dois picos bem definidos correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S devem ser observados (com razão de aproximadamente 2:1) para que uma amostra de RNA total seja considerada de alta qualidade. Foi utilizado um RNA da linhagem HeLa para a confecção do gráfico.

d) Síntese de cDNA por um ciclo

Para a síntese da primeira fita de cDNA adiciona-se 5 µg de RNA total em um tubo de 0,2 mL, 2 µL do controle de RNA poli-A devidamente diluído (1:10.000), 2 µL de *T7-Oligo (dT) Primer* (50 µM) e água *RNase-free* suficiente para se obter um volume final de 12 µL. Agitar cuidadosamente e minifugar (centrifugar brevemente por 5 segundos). Incubar por 10 minutos à 70 °C e resfriar imediatamente a 4 °C por 2 minutos.

Para reação de síntese da primeira fita foram adicionados 4 µL de 5x *First Strand Reaction Mix*, 2 µL de nucleotídeos, 1 µL de dNTPs (10 mM) e 1 µL de DTT (0,1 M) (ditiotreitól), totalizando um volume de 19 µL. Após homogeneizar, minifugar, e após ser incubada à 42 °C por 2 minutos, adicionou-se 1 µL de *SuperScript II* e incubou-se novamente à mesma temperatura por 1 hora, e posteriormente à 4 °C por 2 minutos.

Para a síntese da segunda fita de cDNA foi preparado o mix para segunda fita adicionando 91 µL de água *RNase-free*, 30 µL de *Second Strand Reaction Mix*, 3 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL *E.coli DNA ligase*, 4 µL *E.coli DNA Polymerase I* e 1 µL *RNase H*, totalizando um volume de 130 µL a ser transferido para cada amostra de síntese de primeira fita, resultando em volume final de 150 µL. A mistura foi então incubada por 2 horas à 16 °C, e logo após foram adicionados 2 µL de *T4 DNA Polymerase*, seguido de nova incubação por 5 minutos à temperatura ambiente.

Ao término da incubação 10 µL de EDTA (0,5 M) foram acrescentados para parar a reação de síntese de segunda fita e proceder com a etapa de purificação.

e) Purificação (*clean-up*) da dupla fita de cDNA formada

Adicionou-se 600 µL de *cDNA Binding Buffer* (tampão de ligação para cDNA) à dupla fita de cDNA sintetizada, agitando por 3 segundos e então o volume foi aplicado no centro da coluna de purificação de cDNA (*cDNA Cleanup Spin Column*) já acoplada a um tubo coletor ou a um tubo de 2 mL. Foi efetuada centrifugação por 1 minuto a 8.000 x g e descartou-se o conteúdo do tubo coletor. 750 µL de *cDNA Wash Buffer* (tampão de lavagem) foram adicionados e seguindo por outra centrifugação de 1 minuto a 8.000 x g. Abriu-se a coluna para centrifugar por 5 minutos na rotação máxima (25.000 x g). A coluna foi então transferida para um tubo novo e devidamente identificado, 14 µL de *cDNA Elution Buffer* (tampão de eluição de cDNA) foram aplicados diretamente na membrana da coluna, e após incubação por 1 minuto em temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada durante 1 minuto na rotação máxima para que ocorra sua eluição. Foi recuperado 12 µL de cDNA eluído.

f) Síntese de cRNA biotina marcado

Para a síntese de cRNAs marcados com biotina utilizou-se o volume de cDNA dupla-fita obtido após o *clean-up* (12 µL), aos quais foram adicionados em tubos de 0,2 mL 4 µL de tampão 10X de transcrição *in vitro* (10X IVT Labeling Buffer), 12 µL de NTPs para marcação *in vitro* (IVT Labeling NTP Mix), 4 µL de mix da enzima para transcrição *in vitro* (IVT Labeling Enzyme Mix) e 8 µL de água RNase-free, resultando em 40 µL de

solução final. A mistura foi homogeneizada, minifugada e então incubada à 37 °C por 16 horas.

g) Purificação do cRNA

Foram acrescentados à reação de transcrição *in vitro* 60 µL de água *RNase-free*, 350 µL de tampão de marcação de cRNA (*IVT cRNA Binding Buffer*) e 250 µL de etanol (96 – 100%). A amostra foi pipetada varias vezes e seu volume (700 µL) foi aplicado em uma coluna de purificação (*cRNA Cleanup Spin Column*) acoplada à um tubo coletor de 2 mL. Foi realizada uma etapa de centrifugação por 15 segundos a 8.000 x g e então a coluna foi transferida para um novo tubo. Foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem para cRNA (*IVT cRNA Wash Buffer*) e repetiu-se a centrifugação. Uma nova etapa de lavagem e centrifugação foi realizada, acrescentando desta vez 500 µL de etanol 80%. Abriu-se a coluna para centrifugar por 5 minutos na rotação máxima (25.000 x g). Depois de transferir a coluna para um novo tubo coletor identificado, aplicou-se diretamente sobre a membrana 11 µL de água *RNase-free* e a amostra foi centrifugada por 1 minuto em rotação máxima para eluir o cRNA purificado. Mais 10 µL de água *RNase-free* foram pipetados e repetiu-se a etapa de eluição. Foi recuperado 21 µL de cRNA purificado, sendo que utilizamos 1 µL para avaliação da quantidade por espectrofotômetro e a qualidade do cRNA foi analisada no Bioanalyzer.

A figura 9 corresponde a um exemplo de amplificação eficiente de cRNA marcado com biotina para experimentos que utilizam um ciclo de amplificação.

Fonte: GeneChip® Expression Analysis Technical Manual. Rev 3 [82].

Figura 9. Eletroferograma representativo de uma amostra de cRNA marcada com biotina e purificada após um ciclo de amplificação. O gráfico mostra a distribuição dos tamanhos dos nucleotídeos para 400 ng de cRNA marcado resultante de um ciclo de amplificação. A média do tamanho é de aproximadamente 1580 nt. Foi utilizado um RNA da linhagem HeLa para a confecção do gráfico.

h) Fragmentação do cRNA

A concentração do cRNA foi ajustada para 0,5 µg/µL com a adição de 6 µl de tampão de fragmentação 5X (*5X Fragmentation Buffer*) e volume de água *RNase-free* suficiente para completar 30 µl. Efetuou-se uma incubação à 94 °C por 35 minutos e então a reação foi colocada imediatamente no gelo. Uma alíquota foi reservada para análise no Bioanalyzer. A figura 10 representa uma amostra devidamente fragmentada. Um procedimento de fragmentação padrão resulta em tamanhos de RNA fragmentados que variam de 35 a 200 bases.

Fonte: GeneChip® Expression Analysis Technical Manual. Rev 3 [82].

Figura 10. Eletroferograma representando uma amostra de cRNA fragmentada. O gráfico apresenta a distribuição dos tamanhos de nucleotídeos de 150 ng de cRNA marcado e fragmentado resultante de um ciclo de amplificação. A média dos tamanhos é de aproximadamente 100 nt. Foi utilizado um RNA da linhagem HeLa para a confecção do gráfico.

i) Hibridização

Para a hibridização à plataforma, os *genechips* ficaram dispostos no *Hybridization Oven 640, Affymetrix, P/N 800139 220V*. Partindo de 5 µg de cRNAs fragmentados foram adicionados 1,7 µl de oligonucleotídeo controle B2 (3 nM); 5 µl de controle eucariótico para hibridização (20X); 1 µL de *Herring Sperm DNA* (10 mg/mL); 1µL de BSA (50 mg/mL), 50 µL de tampão de hibridização 2X (200 mM MES, 2M [Na⁺] , 40 mM EDTA, 0,02% Tween-20); 10 µL de DMSO e água em volume suficiente para completar 100 µL de solução. A mistura foi incubada a 99 °C por 5 minutos e a 45 °C por mais 5 minutos, e então transferida para o *genechip* do *array GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array* (Affymetrix INC) previamente lavado com tampão de hibridização 1X (100 mM MES, 1 M [Na⁺] , 20 mM EDTA, 0,01% Tween-20) e incubado a 45 °C por 10 minutos em rotação constante. A hibridização é mantida a 45 °C numa rotação de 60 rpm por 16 horas.

Após o período de incubação para hibridização das amostras, as demais etapas foram realizadas no aparelho *Fluidics Station 400 ou 450/250*, operado com o software *GCOS (Affymetrix GeneChip Operating)/Microarray Suite*. Os *genechips* foram submetidos a 10 ciclos de lavagem a 25 °C com tampão não estrigente (6X SSPE, 0.01% Tween-20) e 8 ciclos de lavagem a 50 °C com tampão estrigente (100 mM MES, 0.1 M [Na⁺], 0.01% Tween-20). Em seguida, os *genechips* foram deixados por 10 minutos a 25 °C em solução *SAPE (Streptoavidin-Phycoerythrin)*, constituída de 600 µl de *Stain Buffer (2X)*; 48 µl de BSA (50 mg/mL); SAPE (1 mg/mL) e 540 µl de água deionizada. Após nova lavagem de 10 ciclos com tampão não estrigente a 30 °C, os *arrays* foram incubados por 10 minutos em solução contendo anticorpo (300 µl de *Stain Buffer 2X*; 24 µl de BSA (50 mg/mL); 6 µl de *Goat IgG Stock* 10 mg/mL; 3,6 µl de anticorpo biotinilado 0,5 mg/mL e 266,4 µl de água deionizada) e submetidos à segunda etapa de incubação em solução *SAPE* por 10 minutos e 25 °C. A lavagem final consistiu em 35 ciclos a 35 °C utilizando tampão não estrigente.

Seguindo o protocolo as lâminas foram digitalizadas e analisadas conforme *Affymetrix GeneChip Scanner 3000*.

3.8.1. Análise da Qualidade

A avaliação da qualidade do ensaio foi realizada pelo software *Affymetrix GeneChip Operating (GCOS)*.

a) Análise da Imagem (Presença de Oligo B2)

Após a imagem dos *genechips* ser gerada pelo *Affymetrix GeneChip Scanner 3000*, sua área foi toda inspecionada para identificar a presença de artefatos, tais como manchas ou riscos. Além disso, a hibridização do Oligo B2 foi também utilizada como parâmetro para avaliação da imagem gerada. O Oligo B2 serve como controle positivo da hibridização e também é usado pelo software para localizar a “grade” que define a área de cada *spot*. Foram considerados *chips* de qualidade satisfatória aqueles que apresentaram o contorno, os cantos e o nome visíveis (Figura 11), visto que essas são as principais regiões relacionadas à hibridização deste oligo.

Este software além de avaliar a eficiência da hibridização das amostras nos *genechips* também mostra a eficiência do processo de marcação do cRNA com biotina e a qualidade do RNA em si.

Figura 11. Imagens da hibridização do Oligo B2 obtidas pelo *Scanner 3000*.

Cada quadrado representa uma região *cell*. A. Padrão alternado de hibridização do Oligo B2 em um dos cantos e nas bordas do *chip*. B. Visualização do nome da lâmina também pela hibridização com esse oligo.

b) Cálculo do *background* e valores de ruído

Foram verificados os valores médios de *background* (intensidade de fundo) e *noise* (ruído). A intensidade de fundo é calculada a partir da divisão

do *array* em 16 regiões retangulares de tamanho igual, no qual os valores de menor intensidade (2%) são medidos em cada região e a média dessa intensidade é calculada. Para o cálculo do ruído, as mesmas regiões são usadas, são selecionados os 2% menores valores de *background* e o desvio padrão desses valores são as zonas de ruído. Segundo o fabricante, os valores de *background* aceitáveis devem ser menores que 100 e o ruído deve ser menor que 5,0 para *arrays* processados no *GeneChip® Scanner 3000*.

c) Porcentagem de genes presentes

A porcentagem de genes presentes em cada *genechip* foi determinada seguindo um procedimento em dois passos. Primeiramente foi calculado para cada par de sondas representativas de um gene um valor denominado *Discrimination Score* [R], que descreve sua habilidade para detectar de forma específica o transcrito-alvo correspondente. O valor de [R] representa a medida relativa entre a diferença de intensidade de sinal alvo-específica (PM-MM) e a intensidade de sinal global (PM+MM):

$$R = (PM-MM) / (PM+MM).$$

De acordo com essa fórmula, seqüências que possuem altos valores de intensidade de MM resultam em redução no valor de R, indicando grande probabilidade de hibridização não específica (figura 12):

Figura 12. Desenho representativo da variação do valor de R em função da intensidade de sinal das sondas MM. (A) Conjunto de sondas PM e MM em um dado *probe set*, com valores crescentes de sinal oriundo das sondas MM (flecha vermelha). (B) Gráfico representativo da relação entre os valores de R (eixo y) e o aumento na intensidade de sinal das sondas MM (eixo x). A linha tracejada representa o valor *threshold* Tau, usado como referência para calcular o *Detection p-value*.

No próximo passo, os valores de [R] foram comparados a um valor *threshold* Tau (padrão = 0.015) pelo teste estatístico *One-Sided Wilcoxon's Signed Rank*. Considerando a distância entre [R] e Tau obtida para cada par de sondas, esse teste calcula um *Detection p-value*, o qual determina se o gene em questão pode ser considerado presente, marginal ou ausente, utilizando níveis de significância estatística α_1 e α_2 . Valores de [R] baixos (próximos a Tau) estão relacionados à incapacidade de discriminar os sinais oriundos das sondas PM e MM indicando, portanto, a possibilidade de hibridização inespecífica. Caso isso ocorra para a maioria dos pares de sondas representativas de um dado gene, o *p-value* obtido para esse gene será alto, e, portanto, será considerado marginal ($\alpha_1 < p\text{-value} < \alpha_2$) ou ausente ($p\text{-value} > \alpha_2$).

De acordo com os critérios adotados pelo programa, a porcentagem de genes presentes para cada amostra deve estar em torno de 40%, porém os valores são dependentes de múltiplos fatores, tais como tipo de célula ou tecido, tipos de sondas, interferências ambientais e qualidade do RNA.

d) Controles externos de amplificação: *lys*, *phe*, *thr*, *dap*

Dap, *Lys*, *Phe*, *Thr* (espécie *B. subtilis*) são genes de *B. subtilis* que foram modificados pela adição de calda poli-A. Moléculas de RNA desses genes são adicionadas durante o preparo das amostras, podendo assim ser utilizadas para monitorar todo o processo de amplificação e marcação do RNA mensageiro. Devem ser considerados presentes em todas as amostras, com intensidades de sinal crescentes de acordo com sua concentração na solução: *lys*<*phe*<*thr*<*dap*.

e) Controles de hibridização: *bioB*, *bioC*, *bioD* e *cre*

Além do Oligo B2, outras moléculas de RNA amplificado e biotilado são adicionadas (*20X Eukaryotic Hybridization Controls*) nas amostras a serem hibridizadas. Correspondem aos genes *bioB*, *bioC* e *bioD* (*E.coli*) e *cre* (bacteriófago P1). Todos eles devem estar sempre presentes, com sinais crescentes de intensidade de acordo com suas concentrações finais na mistura: *bioB* (1,5 pM) < *bioC* (5 pM) < *bioD* (25 pM) < *cre* (100 pM).

f) Controles internos de amplificação

Representam os genes constitutivos da amostra, tais como ACTB (β -actina) e GAPDH. São utilizados para verificar tanto a qualidade do RNA da amostra como a eficiência do processo de amplificação, que, por iniciar-se a 3' do RNA total pode reduzir a representatividade dos transcritos situados a 5', resultando em viés experimental. Esse viés pode ser avaliado pela razão entre as intensidades de sinal dos *probe sets* que representam as regiões a 3' e 5' desses genes, a qual deve estar em torno de 3,0.

3.8.2. Análise dos dados de *microarray*

Figura 13. Esquema representativo das análises do perfil de expressão gênica.

As imagens digitalizadas dos *genechips* foram analisadas utilizando o software R (<http://www.R-project.org>) com a biblioteca “Affy” do Bioconductor URL (<http://www.bioconductor.org>) [83].

Bioconductor é um software grátis, de fonte e desenvolvimento abertos, projetado para análise e compreensão de dados genômicos gerados por experimentos de biologia molecular. Ele é baseado na linguagem de programação estatística R, mas apresenta contribuições de outras linguagens de programação. Em computação, R é uma linguagem e ambiente de programação para realização de análises estatísticas computacionais e também para construção de gráficos.

A normalização foi realizada utilizando o método RMA (*Robust Multiarray Analysis*), introduzido por Terry Speed, Rafael Irizarry e colaboradores [84]. Este algoritmo executa a correção do ruído de fundo (*background correction*), a normalização dos dados e a *probe summarization* para converter os níveis de intensidade dos *probes* em valores de expressão de genes. Para tanto, ele utiliza arquivos de extensão “.cel”, ou seja, arquivos sem nenhuma correção prévia.

Correção do ruído de fundo baseia-se nos pares de nucleotídeos designados *PM*, isto é, considera somente a hibridização realizada em *probes PM*, ignorando completamente a leitura de *probes MM*. O método inicia computando intensidades de *background*-corrigidas de *perfect match* para cada *probe* do *genechip*. As intensidades corrigidas de *background* são computadas de uma maneira que resulta apenas em valores positivos corrigidos de *background*.

Após esta etapa, o logaritmo de base 2 de cada intensidade *perfect match* de *background*-corrigida é obtida. Esses valores são então normalizados utilizando o método de normalização *quantile* desenvolvido por Bolstad *et al*, (2003) [85]. Neste método de normalização utiliza a intensidade bruta de todos os *genechips* para construir a intensidade média de todos os *probes*. É calculada a média dos maiores valores de intensidade já corridos, e os valores individuais são substituídos pela média. Este processo é repetido com o que era originalmente a segunda maior intensidade corrigida de *background* e de PM log-transformada de cada *genechip*, e assim com os seguintes valores.

A *probe summarization* utiliza a *Median Polish* de Tukey para seguir o modelo linear nos dados já corrigidos e normalizados convertidos para o log de base 2 a fim de estimar o real valor da expressão dos genes.

Após as etapas de pré-processamento dos dados resultante dos experimentos de *microarray*, o próximo passo é a obtenção de genes diferentemente expressos dentro de cada grupo de comparação pelo uso de ferramentas estatísticas.

Os genes diferencialmente expressos foram determinados após comparações dois-a-dois (CTRL (controle) x 0,5 nM de vitamina D e CTRL x 100 nM de vitamina D) utilizando teste estatístico SAM (*Significance Analysis Of Microarray*), considerando apenas os conjuntos de genes que apresentaram valores de FDR (*False Discovery Rate*) iguais ou inferiores a 5.

SAM é um teste-t modificado que encontra genes significativamente regulados em experimentos de *microarray* [86]. Este método designa um valor para cada gene presente no *genechip* de *microarray* baseado na mudança de expressão do gene em cada grupo de comparação. A significância estatística é estimada usando teste de permutação no qual os valores observados são comparados aos resultados de *repeated measurements* a partir de um *data set* de genes. Uma característica do SAM é a habilidade de disponibilizar o valor de FDR, ou seja, o percentual de genes selecionados pelo método ao acaso. O usuário pode ajustar o parâmetro chamado delta para ajustar o FDR.

Os genes diferentemente expressos obtidos estatisticamente foram submetidos à análise pelos programas *ToppGene Suíte* (<http://toppgene.cchmc.org/>), *Gene Ontology Tree Machine tool (GOTM)* (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>) e *Ingenuity Pathway Analysis* (<http://www.ingenuity.com/>) para determinar possíveis funções biológicas ou vias representativas induzidas ou reprimidas pelo tratamento de vitamina D em fibroblastos associados a câncer de mama.

3.9. RT-PCR em Tempo Real

a) Desenho dos iniciadores

O desenho dos iniciadores foi realizado com o programa *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), a partir da sequência de mRNA do gene em questão, representada no banco de dados

do *Nucleotide* (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide). Os iniciadores direito e reverso foram desenhados, seguindo os seguintes critérios:

- localização em éxons diferentes, o que possibilita reconhecer a amplificação de seqüência genômica contaminante;
- íntron extenso, o que minimiza a possibilidade de amplificação de possíveis seqüências genômicas contaminantes;
- temperatura de alinhamento dos iniciadores em torno de 60 °C, disponibilizada pelo próprio programa *Primer3*;
- diferença de temperatura de alinhamento entre os iniciadores direito e reverso de cada par de até 1 °C;
- conteúdo de CG próximo de 50%;
- tamanho do amplificado entre 80 e 150 pb;
- região de desenho dos iniciadores localizada mais próxima possível à extremidade 3' da seqüência do RNA mensageiro.

A análise da homologia com outras seqüências foi feita com a ferramenta *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) e a formação de estruturas secundárias foi avaliada pelo programa *OligoTech versão 1.00* (Copyright , 1995). O gene normalizador utilizado foi o GAPDH.

b) Síntese de cDNA

Para síntese de primeira fita, foi utilizado o kit *Superscript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Preparou-se de 3 a 5 µg de RNA total em um volume suficiente de água DEPC para completar 12 µL de volume final. Após adicionar 1 µL de *Oligo dT₍₁₂₋₁₈₎ primer* (0,5 µg/µL) e 1 µL *dNTPs*

mix (10 mM), a reação foi incubada a 65 °C por 5 minutos para permitir o anelamento do iniciador na cauda *poliA* do RNA mensageiro. Em seguida, o tubo foi colocado no gelo para adição de 4 µL de 5X *first strand buffer*, 1 µL de *DTT* (0,1 M) e 1 µL de *Superscript III RT* (200 U/µL), resultando em um volume final de 20 µL. Incubou-se a reação a 55 °C por 45 minutos para a extensão das fitas de cDNA. A inativação da enzima ocorreu após incubação a 70 °C por 15 minutos.

A eficiência da síntese, a integridade do cDNA sintetizado e a ausência de cDNA genômico foram observados após corrida em gel de agarose 1,5% de reações de PCR convencional para o gene GAPDH.

c) PCR convencional

Para as reações de padronização das quantidades de *primers* de cada gene, foi utilizado o cDNA sintetizado a partir de uma amostra da linhagem celular mamária HB4a. Utilizou-se o kit *Taq DNA Polymerase, Recombinant* (Invitrogen). As reações para cada amostra foram utilizados 20 ng de cDNA, aos quais foram adicionados: 2 µL de 10X *PCR buffer*, 2,5 µL de *dNTP mix* (2 mM), 1 µL de iniciador direito (2 µM), 1 µL de iniciador reverso (2 µM), 0,6 µL de MgCl₂ (50 mM) e 0,3 µL de *Taq DNA Polymerase* (5 U/µL) e H₂O *Ultra Pure* (Gibco) para completar 20 µL. Após a desnaturação inicial (95 °C por 5 minutos), foram realizados 40 ciclos em todas as reações; para cada ciclo, utilizou-se as temperaturas de 95 °C (30 segundos) para desnaturação, 60 °C para anelamento de cada par de iniciadores (30 segundos) e 72 °C (30 segundos) para a extensão das fitas

complementares. Nessas condições, observou-se, após corrida em gel de eletroforese 1,5%, se o tamanho do amplificado correspondia ao tamanho desejado e se a reação apresentou bandas inespecíficas.

d) RT-PCR em Tempo Real

Nos experimentos de RT-PCR em tempo real foi utilizado o reagente *SYBR Green* (Applied Biosystems), o qual emite fluorescência ao se intercalar entre as moléculas de fita dupla de DNA e ser excitado. Uma vez que a cada ciclo da reação novas moléculas de fita dupla são formadas, o nível de fluorescência emitida aumenta gradualmente, sendo que quanto menor o ciclo em que a fluorescência atinge o limite determinado pelo aparelho, maior é o nível de expressão do transcrito analisado [87].

Valores quantitativos são obtidos durante a ciclagem, no ponto em que a amplificação do produto é detectada, ao invés da quantidade do produto acumulado ao final de um determinado número de ciclos. O parâmetro *Ct* (*Cycle threshold*) é definido como uma fração do número de ciclos na qual a fluorescência emitida ultrapassa um padrão estabelecido, sendo os dados de quantificação analisados pelo software de análise do aparelho [87].

Nesta metodologia, a confirmação da especificidade da amplificação é realizada por meio da análise da curva de dissociação. Após o término dos ciclos de amplificação da reação, a temperatura varia gradualmente de 95 °C, à 60 °C, e posteriormente à 95 °C novamente, fazendo com que os fragmentos amplificados fita-dupla que se dissociaram aos 95 °C, voltem a

se unir aos 60 °C emitindo fluorescência. Essa emissão é captada pelo aparelho, que então gera a curva de dissociação. Cada produto amplificado possui uma temperatura de fusão específica, o que permite a diferenciação entre os produtos resultantes.

As reações foram realizadas em duplicata no aparelho *ABI Prism® 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) em placas de 96 wells - *MicroAmp® Optical* (Applied Biosystems).

Para as análises de diferença de expressão, foram utilizados 2 µL de cDNA a 3 ng/µL (6 ng final de cDNA) correspondente às amostras controle (CTRL) e tratadas (0,5 nM e 100 nM de VD₃). Cada reação foi realizada a partir de 0,25 µL de iniciador direito (10 µM), 0,25 µL de iniciador reverso (10 µM), 6,25 µL de *SYBR® Green Power Master Mix* (Applied Biosystems) e 3,75 µL de *H₂O Ultra Pure* (Gibco), resultando em um volume final de 12,5 µL. As amostras foram submetidas a uma temperatura de desnaturação inicial de 95 °C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de amplificação, que consistiram em: desnaturação a 95 °C (15 segundos) e anelamento dos iniciadores a 60 °C (1 minuto). A especificidade da reação também foi confirmada por gel em eletroforese 1,5% (item 5e) considerando os mesmos critérios utilizados para confirmar a especificidade das reações de PCR convencional (tamanho do amplificado e presença de bandas inespecíficas).

e) Eletroforese em gel de agarose 1,5%

A integridade dos cDNAs e a especificidade de amplificação durante as reações de PCR convencional e RT-PCR em Tempo Real foram

avaliados por eletroforese em gel de com 1,5% de agarose dissolvida em TBE 1X (Tris-base 0,08%, ácido bórico 0,55% e EDTA 0,1 M, pH 8.0) e 10% v/v de solução de brometo de etídio. As amostras foram preparadas adicionando-se ao volume total da reação (12,5 µL), 1 µL de tampão de *DNA* (xileno cianol 10X). Também foram utilizados marcadores de peso molecular *DNA ladder* 100 pb e 50 pb (Invitrogen). A voltagem utilizada foi de 80 a 100 volts.

3.9.1. Análise dos dados de RT-PCR em tempo real

a) Cálculo da eficiência de amplificação dos iniciadores

Para todos os pares de oligonucleotídeos foi realizada a cinética de amplificação numa reação de RT-PCR em tempo real utilizando 4 diferentes quantidades de cDNA obtidas por meio da diluição seriada de amostras originais de linhagem de mama normal HB4a e de fibroblastos provenientes de uma amostra de tecido mamário normal. A partir de uma concentração inicial de 50 ng/µL de cDNA, foram obtidas quatro diluições seriadas na proporção 1:2 e 1:4, dependendo do nível de expressão de cada gene, ou seja, para genes menos expressos foram foi utilizada diluição 1:2, e para genes mais expressos, diluição 1:4. Como foram utilizados 1 µL de cada diluição nessas reações, as quantidades de cDNA para cada curva variaram de 50 ng a 0,78125 ng ou de 50 ng a 6,25 ng. As reações foram realizadas em duplicatas para cálculo da eficiência de amplificação ($Ef = 10^{(-1/slope)}$), em que *slope* corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a

variação do *Ct* dos transcritos alvo e do gene endógeno em função do *log* das diferentes quantidades de cDNA. Foram aceitos de eficiência com variação de até 10% (90-110%).

b) Análises dos dados de expressão

Para cálculo da medida relativa de expressão foi utilizado o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001) [88] que leva em consideração a eficiência de amplificação de cada par de iniciadores (figura 14), em que *E* alvo corresponde à eficiência de amplificação dos *primers* específicos para o transcrito alvo, *E* endógeno corresponde à eficiência de amplificação dos *primers* específicos para o gene endógeno, ΔC_t alvo corresponde à diferença entre o *Ct* do transcrito alvo obtido para a amostra em análise e o *Ct* do transcrito alvo obtido para a amostra calibradora ou referência, ΔC_t endógeno corresponde à diferença entre o *Ct* do gene endógeno obtido para a amostra em análise e o *Ct* do gene endógeno obtido para a amostra referência.

O cDNA de fibroblastos provenientes de uma amostra de tecido mamário normal foi utilizada como amostra referência nos experimentos de RT-PCR em tempo real. Assim, este cDNA foi utilizado em cada uma das placas de reação de RT-PCR em tempo real.

$$\text{Expressão relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}} + 1)^{\Delta C_t \text{ alvo}}}{(E_{\text{endógeno}} + 1)^{\Delta C_t \text{ endógeno}}}$$

Figura 14. Modelo matemático para quantificação relativa em RT-PCR em tempo real (Pfaffl 2001).

c) Determinação das diferenças de expressão

A expressão diferencial dos produtos de interesse foi determinada a partir dos dados normalizados pelo método de quantificação relativa considerando um gene calibrador [88], apresentado no item anterior.

Para determinar as diferenças de expressão de cada gene em 1 ou 2 grupos de amostras foi utilizado o programa computacional *SPSS (Statistics Packet for Social Sciences)*, versão 15.0 (*SPSS*, Chicago, IL, USA).

Para estudar a expressão gênica os valores de expressão relativa foram transformados em logaritmo natural (ln) com a intenção de diminuir o impacto de valores extremos.

A distribuição dos valores relativos obtidos para cada um dos genes foi verificada utilizando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk [89]. Esta é uma análise (semi/não) paramétrica de variância que detecta a não-normalidade de distribuição de um grupo de dados. O teste é apropriado para amostras entre 3 a 5000 dados. A hipótese nula (H_0) do teste é que a amostra apresenta distribuição Normal. Assim, para p -valores $< 0,05$, rejeita-se H_0 , rejeitando a suposição de normalidade. Os resultados desta análise foram utilizados para a escolha do teste estatístico adequado.

Para calcular a expressão relativa dos genes com distribuição Normal, foi aplicado o teste T-Student pareado, e para aqueles que não apresentaram distribuição Normal, foi utilizado o teste de Wilcoxon. Foram considerados como diferentemente expressos após o tratamento com VD_3 os genes que apresentaram $p < 0,05$.

3.10. Correlação entre os dados resultantes das técnicas de *microarray* e RT-PCR em tempo real

A análise de correlação entre os dados obtidos pelas técnicas de oligo *microarray* e de RT-PCR em tempo real foi realizada pelo teste de correlação linear de Pearson (paramétrico) ou por Spearman (não-paramétrico). Os parâmetros adotados para a interpretação dos valores de correlação (ρ) foram:

- $\rho \geq 0,7$ - forte correlação;
- $0,3 \leq \rho \leq 0,7$ - correlação moderada;
- $\rho \leq 0,3$ - correlação fraca;
- $\rho = 0$ - correlação nula.

Valores positivos indicam correlação positiva dos dados, e assim valores negativos indicam correlação negativa.

4. RESULTADOS

4.1. Cultura de células

Neste estudo foram incluídas, de modo prospectivo, pacientes pós-menopausadas atendidas no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), com hipótese diagnóstica comprovada por exame histopatológico de carcinoma invasivo da mama, estágio clínico II-III, não submetidas à quimioterapia neoadjuvante. Todas as pacientes foram instruídas sobre a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

Após a retirada da massa tumoral, o patologista do Departamento de Patologia do IBCC selecionou para este estudo um fragmento de tecido rico em células tumorais e sem presença visível de fibrose.

As amostras foram então processadas seguindo protocolo descrito no item 3.3. Foram obtidas cinco amostras, denominadas 08.FAC (fibroblasto associado ao câncer), 09.FAC, 10.FAC, 11.FAC e 12.FAC.

A análise histopatológica da peça cirúrgica confirmou a natureza neoplásica da lesão, conforme classificação da AJCC (6ª edição) e características fenotípicas do tumor, como a expressão do receptor de estrógeno, progesterona e HER2, a expressão dos genes p53 e CD34 e o acometimento linfonodal (Tabela 2).

Tabela 2. Status das amostras.

Número	Idade	TH	GH	p53	ER	PR	CD34	LN	HER2
08	57a 4m	CDI	II	+	+++	++	+	-	++/+++
09	66a 5m	CDI	II	+	++++	+	+	+	++/+++
10	41a 2m	CDI	II	-	++	+++	+	-	+++ /+++
11	49a 5m	CDI	II	-	-	-	+	+	+++ /+++
12	82a	CDI	III	-	-	-	+	+	+++ /+++

TH: tipo histológico; GH: grau histológico; CDI: carcinoma ductal invasivo; ER: receptor de estrógeno; PR: receptor de progesterona; CD34: marcador de angiogênese; LN: comprometimento linfonodal, HER2: receptor HER2. A idade foi contada em anos (a) e em meses (m).

4.2. Reações de imunofluorescência

4.2.1. Caracterização da cultura celular primária

Apesar da utilização de um meio de cultura seletivo para fibroblastos (*DMEM*) acrescido de 20% de soro fetal bovino, e utilização das células somente após a passagem 3, ainda assim existe a necessidade de confirmar as culturas primárias como sendo realmente populações de fibroblastos.

Existem vários marcadores de fibroblastos bem estabelecidos, porém nenhum dentre eles é expresso exclusivamente por fibroblastos e expresso por todos os fibroblastos de uma cultura. Além disso, os fibroblastos derivados de tecido mamário são altamente heterogêneos, e aqueles originários de diferentes sítios refletem uma substancial diversidade topográfica [57].

Pensando nisto, selecionamos três marcadores celulares muito utilizados na literatura para identificação de fibroblastos (α -actina de músculo liso, vimentina e S100A4).

A expressão de α -actina de músculo liso é o indicador mais utilizado para a identificação de miofibroblastos ou FACs. Essa isoforma de actina encontra-se também expressa em células da vasculatura do músculo liso [58].

A proteína de filamento intermediário vimentina encontra-se presente em células de origem mesenquimal e apresenta-se constantemente expressa em fibroblastos [90 - 92]. Desta forma, a expressão de vimentina é utilizada como um marcador de fibroblastos em diversos tecidos.

A proteína S100A4 é um membro da vasta família de proteínas ligadoras de Ca^{2+} S100 que apresentam papéis regulatórios em diversas atividades biológicas. Evidências baseadas tanto em formações espontâneas de metástase em roedores quanto em modelos experimentais de linhagens celulares de cânceres humanos tem demonstrado o papel desta proteína no desenvolvimento do processo de metástase [93, 94]. Em um estudo retrospectivo com pacientes de câncer de mama, a expressão de S100A4 foi detectada por imunohistoquímica em 41% dos carcinomas e apresentou uma correlação significativa com ocorrência de óbito [95], demonstrando que a expressão desta proteína representa um pior prognóstico para o paciente.

Deste modo a expressão de S100A4 pode ser utilizada como um marcador para fibroblasto [96], e também pode ser um indicador de maior malignidade da população de fibroblastos.

Para verificar a pureza das populações das culturas estabelecidas observando se há presença de outros tipos celulares, foi também analisada a expressão de marcador de células epiteliais (citoqueratina) e de um marcador de células endoteliais (CD31).

As citoqueratinas constituem uma família de proteínas solúveis em água que formam o citoesqueleto de células epiteliais. Sua expressão caracteriza células de origem epitelial [97, 98].

Entre as moléculas de adesão celular endoteliais, o CD31 ou *PECAM-1* (*platelet-endothelial cell adhesion molecule*) apresenta um papel distinto por ser expresso em vários dos principais tipos celulares associados ao componente vascular [99], sendo assim responsável pela identificação de populações de células endoteliais.

Após a seleção destes cinco marcadores celulares, iniciaram os ensaios de imunofluorescência. Primeiramente os títulos dos anticorpos foram padronizados. Foram realizados sucessivos ensaios de imunofluorescência utilizando diferentes títulos para cada um dos anticorpos primários, e após análise dos resultados as concentrações dos anticorpos foram padronizadas segundo o quadro 1.

Quadro 1. Valores padronizados de anticorpos primários utilizados nos ensaios de caracterização.

Anticorpo anti-	Tipo celular característico	Concentração padronizada
SMA	miofibroblasto	1:50
VIM	fibroblasto	1:200
S100A4	fibroblasto	1:150
CK	epitelial	1:100
CD31	endotelial	1:50

SMA: α -actina do músculo liso; VIM: vimentina; CK: pan-citoqueratina.

Foram também padronizadas as concentrações dos anticorpos secundários Alexa 488 anti-IgG camundongo e Alexa 488 anti-IgG coelho em 1:500.

Após a etapa de padronização seguimos para os ensaios visando caracterizar as populações celulares estabelecidas em culturas das cinco amostras selecionadas para o presente estudo. A figura 15 apresenta um painel com imagens obtidas por microscopia confocal contendo as cinco populações celulares e os cinco marcadores utilizados na caracterização. Em verde estão representados os marcadores celulares e a cor azul corresponde ao corante nuclear fluorescente DAPI (*4,6-diamidino-2-phenylindole*).

Para garantir que o resultado negativo quanto à expressão de citoqueratina foi resultado da ausência de expressão desta proteína pelas células e não devido à ineficiência da reação de imunofluorescência, nós realizamos um ensaio utilizando a linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, que sabidamente expressa citoqueratina, e

anticorpos anti-citoqueratina. Esse ensaio corresponde ao controle positivo da reação de imunofluorescência para citoqueratina (resultado demonstrado na figura 15). Assim podemos realmente garantir que as culturas celulares das amostras testadas não apresentam células epiteliais em sua população.

Figura 15. Caracterização das populações celulares das amostras 08.FAC, 09.FAC, 10.FAC, 11.FAC e 12.FAC. (A) α -actina do músculo liso. (B) Vimentina. (C) S100A4. (D) CD31. (E) Citoqueratina, (Cp) Controle positivo da reação da citoqueratina. O corante nuclear DAPI está representado em azul. As imagens foram capturadas em aumento de 20x.

Tendo em vista os resultados obtidos, podemos concluir que as populações celulares correspondentes às culturas primárias das cinco amostras analisadas puderam ser caracterizadas como sendo populações de fibroblastos devido à expressão das proteínas vimentina e S100A4. Pode-se verificar também a ausência de expressão de citoqueratina e CD31, confirmando assim a pureza das populações celulares de fibroblastos. Além disso, a expressão de α -actina de músculo liso indica tratar-se de miofibroblastos.

4.2.2. Determinação de receptores de vitamina D (VDR)

A expressão de VDR é um importante determinante de resposta celular à vitamina D. As diversas ações antitumorais da vitamina D estão relacionadas não só ao nível de expressão de seu receptor, como também à localização do VDR [100]. Após ser sintetizado no citoplasma celular, sinais de sinalização nuclear da proteína VDR dirigem o receptor para dentro do núcleo. Após a ligação da vitamina D com o domínio de ligação hormonal do receptor, o VDR é estabilizado e inicia-se assim toda a cascata de transcrição modulada pela vitamina D [6].

Deste modo a presença de VDR no núcleo celular é determinante para que o tratamento com vitamina D proposto por este projeto tenha alguma ação sobre as células em cultura.

Com a finalidade de verificar a presença de receptores de vitamina D nas amostras utilizadas neste estudo foram realizados ensaios de imunofluorescência utilizando anticorpos anti-VDR.

Para padronizar as reações de imunofluorescência foi utilizada a população de células estabelecidas em cultura proveniente de tecido mamário normal retirado após a realização de cirurgia de mamoplastia redutora (07.FN – fibroblasto normal). Foram efetuados ensaios utilizando o anticorpo secundário FITC IgG anti-rato a uma concentração de 1:100 (valor anteriormente padronizado em nosso laboratório) e as seguintes diluições de anticorpos anti-VDR: 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200. Analisando as imagens, optamos pelo título 1:50 como concentração padrão, pois este se mostrou bastante eficiente na marcação tanto dos VDR no núcleo e também sua síntese no citoplasma celular.

Posteriormente a padronização da técnica seguimos para os experimentos com o objetivo de determinar a presença de VDR nas células em cultura provenientes das amostras 08.FAC, 09.FAC, 10.FAC, 11.FAC e 12.FAC. O resultado das reações está demonstrado na figura 16.

Figura 16. Reações de imunofluorescência para verificação da presença de receptores de vitamina D nas amostras 08.FAC, 09.FAC, 10.FAC, 11.FAC e 12.FAC. (A) Expressão de VDR. (B) Expressão de VDR associada ao DAPI. Fluorescência verde corresponde ao VDR e azul ao corante nuclear DAPI. As imagens foram capturadas em aumento de 20x.

Pode-se notar a expressão da proteína VDR (verde) nas cinco populações celulares estudadas, ressaltando a presença do receptor nos núcleos celulares (azul) da maioria das células de cada uma das culturas.

Portanto, podemos concluir que os fibroblastos em cultura das amostras analisadas apresentam receptores de vitamina D localizados no núcleo.

4.3. Tratamento com vitamina D₃

De acordo com a proposta de estudar os efeitos da VD₃ (calcitriol) em fibroblastos associados ao câncer de mama, o próximo passo é realizar o tratamento das populações de fibroblastos das amostras incluídas no estudo, seguindo condições experimentais descritas em “Casuística e Métodos”.

Trabalhos anteriores efetuando tratamento com VD₃ apresentaram uma ampla variação nas concentrações de vitamina utilizadas. Gache *et al* trataram com VD₃ células epiteliais em cultura durante dois a três dias, utilizando concentrações que variaram de 10⁻¹² (0,001 nM) a 10⁻⁸ M (10 nM) [101]. Zabel *et al* cultivaram linhagens celulares tumorais humanas e murinas originárias de carcinoma medular tireoidiano durante cinco dias na presença e na ausência de VD₃ e análogos em concentrações que variaram de 10⁻⁹ (1 nM) a 10⁻⁶ M (1000 nM) [102]. Taparia *et al* trataram células Caco-2 (linhagem celular humana de câncer de cólon) com 10⁻⁷ M (100 nM) de VD₃ durante oito horas, e também com 10⁻⁶ M do pró-hormônio 25 VD durante 24 horas [103].

Um estudo de farmacocinética indicou que a concentração alcançada *in vivo* após a administração via oral de altas doses de 1α,25(OH)₂D₃ é de até 0,5 nM (cerca de 270 pg/mL) [104]. Os valores de referência para 1α,25(OH)₂D₃ sérica são 60 – 158 pmol/L [105].

Assim, de acordo com dados desses trabalhos e outros envolvendo tratamento com VD₃, e levando em conta análises de farmacocinética, nós optamos por padronizar duas concentrações de VD₃ a serem utilizadas no tratamento dos fibroblastos envolvidos no presente estudo. Os valores são 0,5 nM e 100 nM. Em resumo, a população de fibroblastos de cada uma das amostras foi dividida em três grupos de tratamentos: (1) etanol absoluto (diluente da vitamina D) (grupo controle - CTRL), (2) 0,5 nM de VD₃ e (3) 100 nM de VD₃.

4.4. Citometria de Fluxo

Os efeitos da vitamina D sobre o ciclo celular foram avaliados pelo método de Citometria de Fluxo, através da incorporação de iodeto de propídio (PI).

Os histogramas a seguir (figura 17) mostram a distribuição no ciclo celular do grupo controle (CTRL) e dos grupos tratados com 0,5 nM e 100 nM de VD₃ durante 24 horas dos fibroblastos provenientes da amostra 08.FAC, usado como representativo de todas as amostras.

Figura 17. Efeitos da VD₃ sobre a distribuição do ciclo celular das amostras de FACs. Histogramas correspondentes à distribuição em fases do ciclo da população de fibroblastos provenientes da amostra 08.FAC, utilizando o parâmetro FL2A para representar o conteúdo de DNA. %G1 (M1): porcentagem de células localizadas na fase G0/1; %S/G2/M (M2): células localizadas na fase S/G2/M.

Observando esses gráficos e analisando as porcentagens de células na fase G0/1 do ciclo, é possível perceber que a proporção de

células situadas nessa fase foi constante, independentemente do tratamento e da concentração. Assim, concluímos que o tratamento com VD₃ não alterou a distribuição do ciclo celular em fibroblastos associados ao câncer de mama.

4.5. Hibridização em oligo *microarray*

4.5.1. Extração e purificação do RNA total

A extração de RNA total foi seguindo o protocolo presente no item 3.8.b. Foi realizada leitura espectrofotométrica do RNA total para determinação das concentrações de cada amostra e cada grupo de tratamento, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop. O grau de pureza dos RNAs foi avaliado pelos valores da razão 260/280, que devem estar entre 1,8 a 2,0. Assim, na tabela 3 é possível observar que os RNA extraídos possuíram nível de pureza aceitável para todas as amostras, já que a razão 260/280 apresentou valores muito próximos de 2,0.

Tabela 3. Valores de concentração e relação 260/280 do RNA total obtidos por espectrofotometria.

Amostra		260/280	Concentração (ng/μL)	Total (μg)
08.FAC	Controle	1,94	11795	471,80
	0,5 nM	1,93	16825	673,00
	100 nM	1,93	18834	753,36
09.FAC	Controle	1,94	14944	448,32
	0,5 nM	1,97	8970	269,10
	100 nM	1,96	9959	298,77
10.FAC	Controle	2,02	5282	158,46
	0,5 nM	1,95	4603	138,09

	100 nM	1,95	4205	126,15
	Controle	1,86	2957	88,71
11.FAC	0,5 nM	1,84	2086	62,58
	100 nM	1,84	2512	75,36
	Controle	2,05	11353	681,18
12.FAC	0,5 nM	2,03	11335	680,10
	100 nM	1,94	5882	352,92

260/280: razão entre as absorvâncias de cada amostra a 260 e 280 nm.

O controle corresponde às células acrescidas apenas de etanol absoluto, 0,5 nM e 100 nM correspondem aos grupos de células tratadas com 0,5 nM e 100 nM de VD₃, respectivamente.

Após a verificação da qualidade dos RNAs totais extraídos, foi realizada a etapa de purificação do RNA utilizando o kit *RNeasy Mini* (QIAGEN). A leitura espectrofotométrica do RNA total purificado para cada grupo das três amostras é mostrada na tabela 4, assim como os valores do *RIN* obtidos para cada amostra.

Tabela 4. Valores de RNA total obtidos após etapa de purificação.

	Amostra	260/280	RNA total (µg)	RIN
	Controle	1,98	76,85	8,8
08.FAC	0,5 nM	2,01	64,12	8,6
	100 nM	1,99	62,05	8,3
	Controle	1,93	113,12	8,4
09.FAC	0,5 nM	1,95	114,90	8,8
	100 nM	2,10	140,70	8,3
	Controle	2,07	13,95	8,9
10.FAC	0,5 nM	2,09	16,09	9,3
	100 nM	2,11	17,90	9,1

11.FAC	Controle	1,97	11,97	7,6
	0,5 nM	2,04	9,60	8,5
	100 nM	1,97	15,27	8,9
12.FAC	Controle	2,05	30,02	9,4
	0,5 nM	1,97	8,50	9,8
	100 nM	1,98	38,00	9,0

260/280: razão entre as absorbâncias de cada amostra a 260 e 280 nm; RNA total: quantidade de RNA total obtida depois de realizada a etapa de purificação; *RIN*: número de integridade do RNA.

A avaliação da integridade foi realizada pela leitura das amostras no aparelho *Bioanalyzer* com base nos valores de *RIN* obtidos, demonstrados na tabela 3. É possível observar que todas as amostras apresentaram *RIN* satisfatório ($>7,0$), variando de 7,6 a 9,8.

Na figura 18 (A) pode-se observar uma imagem semelhante à corrida em gel de eletroforese convencional (agarose), na qual é possível observar a presença das bandas 28 S e 18 S. O eletroferograma correspondente a amostra 11.FAC está mostrado em 18 (B), que permite observar a integridade dos picos de fluorescência correspondentes às bandas 28 S e 18 S mostradas em A.

Figura 18. Análise da integridade do RNA total purificado pelo aparelho *Bioanalyzer*.

(A) Visualização das bandas 28 S e 18 S para as amostras correspondentes ao controle (11.FAC ETOH), ao grupo tratado com 0,5 nM de VD_3 (11.FAC 0,5 nM) e ao grupo tratado com 100 nM de VD_3 (11.FAC 100 nM). (B) Eletroferograma correspondente às cinco amostras.

4.5.2. Amplificação e purificação de cRNA

Na tabela 5 estão presentes os resultados da leitura espectrofotométrica do RNA amplificado (cRNA) e já purificado. As quantificações foram feitas na diluição de 1:100.

Todas as amostras passaram nos critérios de pureza de RNA, apresentando valores de razão 260/280 maiores que 1,90, variando de 1,92 a 2,31.

Tabela 5. Valores de cRNA total obtidos após amplificação e purificação de RNA.

Amostra		260/280	Concentração 1:100 (ng/μL)	cRNA total (μg)
08.FAC	Controle	2,02	70,7	141,4
	0,5 nM	2,03	49,2	98,4
	100 nM	2,08	45,7	91,4
09.FAC	Controle	2,03	84,5	169,0
	0,5 nM	2,02	74,2	148,4
	100 nM	2,02	41,1	82,2
10.FAC	Controle	2,02	64,7	129,4
	0,5 nM	1,92	68,2	136,4
	100 nM	1,95	69,1	138,2
11.FAC	Controle	2,21	21,3	42,6
	0,5 nM	2,24	24,3	48,6
	100 nM	2,28	19,9	39,8
12.FAC	Controle	2,31	27,8	55,6
	0,5 nM	2,11	50,5	101,0
	100 nM	2,04	67,2	134,4

260/280: razão entre as absorvâncias de cada amostra a 260 e 280 nm; cRNA total: quantidade de RNA amplificado obtida depois de realizada a etapa de purificação.

As populações de transcritos obtidas após a amplificação do RNA foram analisadas utilizando o aparelho *Bioanalyzer*. A figura 18 mostra o eletroferograma decorrente da análise de uma amostra representativa (11.FAC). Pode-se notar similaridade da distribuição dos produtos amplificados entre os três grupos de tratamento.

Figura 19. Análise da integridade do RNA amplificado e purificado realizada no aparelho *Bioanalyzer*. 11.FAC ETOH: grupo controle; 11.FAC 0,5 nM: grupo tratado com 0,5 nM de VD₃; 11.FAC 100 nM: grupo tratado com 100 nM de VD₃.

4.5.3. Fragmentação do RNA amplificado

Transcritos longos geralmente possuem estruturas secundárias, as quais podem interferir na hibridização e aumentar a chance de ocorrer hibridizações cruzadas não-específicas com os oligos (25 mer) plotados no *array*. Assim, o cRNA marcado é fragmentado em tamanhos menores que variam de 35-200 bases e suas estruturas são menos complexas, aumentando a especificidade e a intensidade do sinal no *microarray*. O desempenho do *array* é diretamente relacionada à quantidade de cRNA fragmentado, sendo uma etapa crítica para a qualidade dos dados gerados.

A figura abaixo corresponde à amostra 11.FAC após fragmentação.

Figura 20. Análise da fragmentação do RNA realizada no aparelho *Bioanalyzer*. 11.FAC CTRL: grupo controle; 11.FAC 0,5 nM: grupo tratado com 0,5 nM de VD₃; 11.FAC 100 nM: grupo tratado com 100 nM de VD₃.

4.6. Análise da qualidade dos dados (GCOS)

4.6.1. *Background* e Porcentagem de genes presentes

Após a hibridização das amostras, o software *GCOS* (*Gene Chip Operating System*) foi utilizado para a análise da qualidade dos experimentos, considerando o cálculo de alguns parâmetros, tais como o valor do *background* médio de cada experimento, o valor do *noise* e a porcentagem de genes presentes. O valor *background* é importante para estimar o ruído experimental resultante de sinais inespecíficos de hibridização. O cálculo desse valor gera um número que deve ser subtraído da intensidade total de cada sequência, o que permite inferir a intensidade de sinal real correspondente à expressão de determinado gene. Durante esse processo, sequências de intensidade menor à do *background* são desconsideradas de posteriores análises de expressão gênica. Após a obtenção desses dados, e considerando o cálculo do valor *Discrimination Score [R]* ($PM-MM/PM+MM$) para cada sonda dentro de um *probe set*, é possível determinar o *Detection p-value* para todos os transcritos, o que

permite calcular o número de genes presentes na lâmina. A tabela 6 mostra os valores desses parâmetros para cada amostra considerada. Para o cálculo do ruído, são selecionados os 2% menores valores de *background* e o desvio padrão desses valores são as zonas de ruído. Segundo o fabricante, os valores de *background* aceitáveis variam entre 20-100 e o ruído deve ser menor que 5,0 para *arrays* processados no *GeneChip® Scanner 3000*.

Adicionalmente, a porcentagem de *probes* presentes indica a qualidade da amostra e depende do tipo celular, de estímulos biológicos e do tipo do *array*. Para nosso estudo, a porcentagem de *probes* presentes aceita para análise varia entre 30-60%.

Tabela 6. Valores de *background*, ruído e porcentagem de *probes* presentes nos *arrays* hibridizados.

Amostra		<i>Background</i> (<100)	<i>Noise</i> (<5,0)	% Presentes
08.FAC	Controle	31,18	1,14	47,1
	0,5 nM	31,43	1,13	43,0
	100 nM	31,41	1,07	42,0
09.FAC	Controle	31,81	1,24	42,5
	0,5 nM	31,90	1,22	42,5
	100 nM	30,86	1,16	42,3
10.FAC	Controle	33,37	1,28	42,9
	0,5 nM	32,02	1,18	42,9
	100 nM	28,67	0,88	39,5
11.FAC	Controle	29,43	0,92	39,2
	0,5 nM	31,13	0,97	41,5
	100 nM	30,27	0,96	38,1
12.FAC	Controle	32,86	1,20	42,9

0,5 nM	30,41	0,98	43,6
100 nM	31,82	1,14	42,0

Considerando os valores apresentados na tabela acima é possível observar que todas as amostras apresentaram valores de *background* entre 20 e 100 (28,67 a 33,37), valores de *noise* menores que 5,0 (0,88 a 1,28) e porcentagem de genes presentes em torno de 40% (38,1% a 47,1%), seguindo os critérios sugeridos pelo fabricante. Além disso, todas as amostras apresentaram esses valores semelhantes entre si, o que permitiria realizar as comparações do perfil de expressão gênica entre as amostras com maior confiabilidade.

4.6.2. Controles positivos de amplificação

Os controles externos são adicionados como uma mistura (Poly-A RNA Control Kit) previamente à amplificação das amostras. As concentrações finais dos controles em relação à população de RNA total das amostras correspondem a 1:100.000 (Lys); 1:50.000 (Phe); 1:25.000 (Thr); 1:7500 (Dap) e, portanto, esses genes devem ser encontrados nessa ordem durante a avaliação dos sinais de intensidade. São avaliados da mesma forma que os controles internos, ou seja, a razão 3'/5' deve estar próxima de 3,0 (tabela 7).

Tabela 7. Razão 3'/5' dos controles externos de amplificação.

Amostra		Controles externos de amplificação			
		Lys	Phe	Thr	Dap
08 FAC	Controle	3,02	1,14	2,91	2,06
	0,5 nM	3,22	1,36	2,19	2,23
	100 nM	3,25	1,06	2,69	2,06
09 FAC	Controle	3,62	1,28	2,42	2,29
	0,5 nM	3,03	1,26	2,75	2,26
	100 nM	3,71	1,43	2,92	2,25
10 FAC	Controle	2,94	0,90	2,00	1,94
	0,5 nM	2,45	1,36	1,91	1,94
	100 nM	3,31	1,01	2,03	1,55
11 FAC	Controle	3,73	1,52	2,56	2,45
	0,5 nM	4,19	1,70	3,20	2,84
	100 nM	3,89	1,70	2,67	2,24
12 FAC	Controle	3,78	1,42	2,75	1,83
	0,5 nM	3,52	1,41	3,08	2,40
	100 nM	2,67	1,11	2,38	1,88

Observando os resultados apresentados na tabela 7, é possível observar que os valores de R 3'/5' se apresentaram em torno de 3,0 para todas as amostras analisadas, confirmando a eficiência da reação de amplificação do RNA mensageiro.

4.6.3. Controles positivos de hibridização

O controle da hibridização é composto por uma mistura de transcritos cRNA biotina-marcados oriundos de *E. coli* denominados bioB, bioC, bioD, bem como um gene recombinante derivado do bacteriófago P1 denominado *cre*, preparados em diferentes concentrações e inseridos na solução de

hibridização. O bioB refere-se ao nível de sensibilidade do ensaio, devendo estar presente em pelo menos 50% das vezes em cada ensaio, já o bioC, bioD e cre devem estar presente em todas as lâminas de cada ensaio. O valor do sinal desses genes (controles de hibridização) na razão 3'/5' não deve exceder 3,0.

Tabela 8. Razão 3'/5' dos controles de hibridização.

Amostra		Controles de hibridização <3,0			
		BioB	BioC	BioD	Cre
08 FAC	Controle	0,80	1,30	2,27	1,04
	0,5 nM	0,89	1,25	1,92	1,17
	100 nM	0,88	1,35	2,10	1,04
09 FAC	Controle	0,87	1,40	2,02	1,04
	0,5 nM	0,85	1,33	1,91	1,02
	100 nM	0,93	1,35	2,11	1,01
10 FAC	Controle	0,87	1,32	2,21	1,09
	0,5 nM	0,94	1,31	2,15	1,10
	100 nM	0,92	1,20	2,03	1,08
11 FAC	Controle	0,76	1,32	2,05	1,06
	0,5 nM	0,81	1,39	2,06	1,08
	100 nM	0,79	1,27	2,38	1,06
12 FAC	Controle	0,87	1,44	2,22	1,06
	0,5 nM	0,80	1,28	2,18	1,08
	100 nM	0,82	1,41	2,26	1,08

É possível observar pela tabela 8 que todas as amostras passaram nesse critério, indicando eficiência de hibridização semelhante entre todas elas. Além disso, em todas as amostras os controles de hibridização estão presentes (dado não mostrado na tabela).

4.7. Análise dos dados de oligo *microarrays*

Algumas etapas devem ser seguidas antes de qualquer dado resultante de experimentos de *microarray* ser analisado para expressão diferencial. O dado bruto deve ter a qualidade testada para assegurar sua integridade. Dados sem processamento estão sempre sujeitos a alguma forma de variação técnica e por esse motivo devem ser pré-processados para remover todas as fontes de variações possíveis, e assim assegurar que os resultados apresentam altos níveis de acuracidade.

As etapas do processo de pré-processamento dos dados são:

- Correção do *background*;
- Normalização dos dados;
- Sumarização dos valores.

O primeiro passo é geralmente a correção do *background* da intensidade de leitura de cada *probe*. *Background* pode ocorrer devido a diferentes fontes, como ligação não-específica da amostra marcada à superfície do *genechip*, resquícios de amostra após as etapas de lavagem ou ruído óptico resultante do processo de escaneamento.

O próximo passo é a normalização, cujo propósito é ajustar os dados apesar da variação técnica respeitando a variação biológica existente entre as amostras. Sempre haverá discrepâncias entre os processos de hibridização para cada *array* e essas variações resultam em diferentes níveis de intensidade de fluorescência entre os vários experimentos. Assim, a

normalização dos dados entre os diferentes *array* possibilita a comparação entre os experimentos.

A etapa final é a sumarização dos dados das 11 diferentes probes PM de cada gene alvo em um único valor de expressão para cada gene em cada um dos *chips*.

O algoritmo utilizado para efetuar o pré-processamento dos dados foi o *Robust Multichip Averaging* (RMA), introduzido por Irizarry *et al.* (2003) [84] e disponibilizado pelo software *R*. Maiores explicações sobre o método encontram-se no item 4.

A figura 21 permite observar os gráficos antes (A e C) e pós (B e D) normalização das amostras controle e tratadas com 0,5 nM e com 100 nM de VD₃.

Figura 21. Intensidades de PM em log2 das amostras tratadas com VD₃. (A e C) Antes da normalização com o algoritmo RMA; (B e D) Após a normalização.

Os valores de expressão de cada gene gerados após a normalização foram então analisados estatisticamente. Para isso foi utilizado o software *MultiExperiment Viewer (MeV)* (<http://www.tm4.org/mev/>), um aplicativo grátis para análise, visualização e filtragem de dados genômicos de larga escala. É uma ferramenta de *microarray* versátil, incorporando algoritmos sofisticados para clusterização, visualização, classificação e análises estatísticas.

O primeiro passo para a obtenção dos genes diferentemente expressos foi a filtragem dos dados normalizados utilizando um filtro por variância. A fim de eliminarmos *probes* que possuam expressão pouco confiável, como *probe sets* de genes que não são expressos em nenhuma das amostras ou *probes* que atingiram a saturação, foi feita uma filtragem prévia por expressão das 54.675 *probes*, antes de prosseguirmos a análise. A partir desta filtragem, é possível eliminar genes com baixa variação de expressão entre as amostras analisadas.

O critério de seleção utilizado foi genes com maiores desvios padrão. Assim, os genes foram ranqueados baseados nos desvios padrão e foram selecionados os 30% que apresentaram maiores valores. Dos 54.675 genes iniciais, 38.273 foram retidos pela filtragem, restando assim 16.402 genes, que seguiram para a etapa estatística.

Dentre os algoritmos disponibilizados pelo *MeV* para realização de análises estatísticas encontra-se o *Significance Analysis of Microarrays* (*SAM*), anteriormente descrito no item 3.8.2..

A) Efeito do tratamento com 0,5 nM de VD₃ em fibroblastos associados ao câncer de mama – GRUPO I

Nossa primeira análise foi verificar o efeito do tratamento com a concentração fisiológica de vitamina D, ou seja, 0,5 nM. Assim, comparamos o perfil gênico dos fibroblastos sem tratamento com o perfil gênico dos fibroblastos submetidos ao tratamento com 0,5 nM de VD₃. Esta análise resultou em 380 *probes* diferencialmente expressos (Anexo A),

representando 274 genes conhecidos (teste SAM pareado, $FDR < 0,05\%$). Todos os genes resultantes apresentaram expressão aumentada em relação ao controle, apresentando valores de *fold* que variaram de 1,13 a 6,70.

B) Efeito do tratamento com 100 nM de VD₃ em fibroblastos associados ao câncer de mama – GRUPO II

Posteriormente foi analisado o efeito do tratamento com a concentração farmacológica de vitamina D, isto é, 100 nM. A comparação do perfil gênico dos fibroblastos sem tratamento com o perfil gênico dos fibroblastos submetidos ao tratamento com 100 nM de VD₃ resultou em 182 *probes* diferencialmente expressos (Anexo B), sendo 161 genes conhecidos (teste SAM pareado, $FDR < 0,05\%$). Destes 126 genes apresentaram expressão aumentada em relação ao controle (*folds* variaram de 1,40 a 515,60) e 35 genes apresentaram expressão diminuída em relação ao mesmo (*folds* variaram de -1,46 a -3,91).

C) Genes diferentemente expressos em comum entre os dois grupos de tratamento

A comparação entre os genes diferentemente expressos resultantes dos dois grupos de tratamento demonstrou haver 21 genes cuja expressão foi alterada por ambas as concentrações de tratamento com VD₃. Estes genes estão encontrados listados na figura abaixo.

Figura 22. Diagrama de Vein demonstrando a intersecção dos genes diferentemente expressos (GDE) resultantes dos dois grupos de tratamento com VD₃. O gráfico demonstra o número de GDE em cada um dos grupos de tratamento, bem como o número de genes em comum entre eles, além de citar quais são esses genes.

4.8. Classificação dos dados de *microarray* em processos biológicos

Os dados obtidos pela análise estatística confirmam que o tratamento com vitamina D ocasionou uma significativa modulação na expressão gênica, sendo que a maioria dos genes apresentou expressão aumentada em relação ao grupo controle. Os genes diferencialmente expressos foram classificados em vias bioquímicas com o uso das ferramentas *ToppGene Suíte* e *GOTM* (ambas disponibilizadas gratuitamente na internet), considerando estatisticamente significativas as classificações

correspondentes a um valor de $p\text{-value} < 0.05$ do teste de correção Bonferroni.

O *ToppGene* é uma ferramenta que realiza o “enriquecimento funcional” de uma lista de genes baseado em transcrito, proteoma, ontologia (*Gene Ontology* - *GO*), entre outras bases de dados. O resultado é a inclusão dos genes nos processos biológicos encontrados como significativos pela análise.

O *GOTM*, assim como o *ToppGene*, também realiza uma análise de enriquecimento das categorias de Ontologia Genética, porém o resultado é visualizado em um gráfico acíclico dirigido (ou *directed acyclic graph* (*DAG*)), que possibilita manter a relação entre as categorias de *GO*.

A) Grupo I

A figura 23 corresponde ao resultado da classificação por processos biológicos dos genes diferentemente expressos resultantes da comparação do Grupo I realizada pela ferramenta *ToppGene*. A análise resultou em 17 vias com significância estatística, dentre elas vias relacionadas aos processos de apoptose (3 vias), morte celular (4 vias), mobilidade (1 via), migração (1 via) e adesão (1 via), entre outras.

Figura 23. Representação gráfica da classificação dos genes provenientes do Grupo I em processos biológicos realizada pela ferramenta *ToppGene*. As barras vermelhas correspondem ao número de genes presentes em cada via. Os pontos e linha azul correspondem aos valores de p . As vias estão ordenadas segundo valores crescentes de p .

Foram também realizadas análises utilizando a ferramenta *GOTM*, que resultaram no DAG mostrado na figura 24. Assim como na análise anterior, esta também teve resultado os processos de anti-apoptose e adesão celular, apresentando respectivamente três e dez genes (demonstrados na figura 24).

B) Grupo II

A figura 25 apresenta os resultados da classificação em vias bioquímicas dos genes diferentemente expressos no grupo II induzidos pela ação da VD_3 .

Figura 25. Representação gráfica da classificação dos genes provenientes do Grupo II e induzidos pela ação da VD_3 em processos biológicos realizada pela ferramenta *TopGene*. As barras vermelhas correspondem ao número de genes presentes em cada via. Os pontos e linha azul correspondem aos valores de p . As vias estão ordenadas segundo valores crescentes de p .

Com relação ao grupo de genes induzido pelo tratamento com 100 nM de vitamina D, a classificação resultou em 43 vias bioquímicas, envolvendo diferentes funções biológicas. Algumas das vias ativadas estão relacionadas ao metabolismo da VD_3 , como desenvolvimento ósseo, ossificação e regulação do remodelamento ósseo, por exemplo. Vias relacionadas a apoptose, migração, adesão e morte celular, estão presentes neste grupo de comparação, assim como no grupo I. São também comuns a esses dois grupos os processos biológicos relacionadas ao desenvolvimento de órgãos, pois ambos apresentam vias derivadas desse processo. Já os processos biológicos de desenvolvimento mesenquimal, diferenciação celular, regulação da proliferação de células epiteliais e regulação da comunicação celular, entre outras, são exclusivas dos genes induzidos pela VD_3 no grupo II. Análises realizadas pelo *GOTM* corroboraram com os dados obtidos (figura 26), e apontaram ainda processos biológicos com um número elevado de genes incluídos nessas classes, como por exemplo, sinalização intra-celular (com 31 genes).

Figura 26. Classificação dos genes provenientes do Grupo II e induzidos pela ação da VD₃ em processos biológicos realizada pelo *GOTM*. Os quadros vermelhos correspondem aos processos enriquecidos e os pretos ao não-enriquecidos. Os quadros azuis apresentam os genes classificados nos processos biológicos indicados pela seta.

Quanto ao grupo de genes inibidos pelo tratamento com 100 nM de vitamina D, apenas uma via bioquímica da cicatrização foi obtida após a classificação pelo *ToppGene* (figura 27). Assim, pode-se notar que ao mesmo tempo em que a ação da vitamina D induz alguns genes de cicatrização, ela também é responsável pela inibição de outros genes relacionados a esse processo.

Figura 27. Representação gráfica da classificação dos genes provenientes do Grupo II e inibidos pela ação da VD_3 realizada pela ferramenta *ToppGene*. A barra vermelha corresponde ao número de genes presentes na via. O ponto azul corresponde ao valor de p .

Mais uma vez ocorreu concordância com os dados obtidos pelas duas ferramentas utilizadas para classificação dos genes em processos biológicos, sendo que além do processo de cicatrização, o *GOTM* apontou ainda outras classes enriquecidas com genes inibidos pela ação da VD_3 , como regulação da atividade de proteína-quinase e cascata MAPKKK (figura 28).

Figura 28. Classificação dos genes provenientes do Grupo II e inibidos pela ação da VD₃ em processos biológicos realizada pelo *GOTM*. Os quadros vermelhos correspondem aos processos enriquecidos e os pretos ao não-enriquecidos. Os quadros azuis apresentam os genes classificados nos processos biológicos indicados pela seta.

4.9. Seleção de genes candidatos à validação por RT-PCR em tempo real

Foram adotados alguns requisitos para a seleção dos genes candidatos à validação por PCR em tempo real. São eles:

- Apresentar valor da diferença de expressão (*fold*) entre controle e tratamento maior que 1,5 ou menor que -1,5;
- Apresentar expressão diferencial em pelo menos 3 das 5 amostras;
- Possuir função conhecida.

Assim, genes que não apresentaram esses requisitos foram excluídos da seleção, e os genes restantes foram analisados segundo os critérios de: (1) participação em vias bioquímicas resultantes das análises utilizando as ferramentas citadas no item acima e (2) valor de *fold*, dando-se preferência a genes com maiores valores. A tabela 9 apresenta os 23 genes previamente selecionados para a validação por RT-PCR em tempo real.

Foram escolhidos quatro genes presentes em ambas as comparações, oito genes resultantes do grupo I e onze genes resultantes do grupo II, dos quais sete foram positivamente regulados pela ação da VD₃ e quatro foram negativamente regulados.

Tabela 9. Genes selecionados como candidatos a validação.

n#	Símbolo	Nome	Fold
1	CYP24A1	cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	6.7010* 515.6076'
2	TGFB2	transforming growth factor, beta 2	2.2409* 4.7363'
3	DUSP1	dual specificity phosphatase 1	1.6681* 1.8366'
4	SLC5A3	solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3	2.1805* 3.54797'
5	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	1.8050*
6	ANXA1	Annexin A1	1.9988*
7	DUSP4	dual specificity phosphatase 4	2.4581*
8	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	1.6238*
9	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	1.6313*
10	FN1	fibronectin 1	1.7410*
11	ADAM10	ADAM metallopeptidase domain 10	1.7196*
12	COL6A1	collagen, type VI, alpha 1	1.8217*
13	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	9.5172'
14	G0S2	G0/G1switch 2	7.3076'
15	SULT1C2	sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	6.0434'
16	THBD	thrombomodulin	5.6131'
17	CD14	CD14 molecule	5.5359'
18	MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13	4.5346'
19	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	3.0955'
20	SERPINB2	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	-2.0638'
21	F2RL2	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	-2.3398'
22	NRG1	neuregulin 1	-3.2330'
23	CSF2RB	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	-3.9128'

1-4: genes provenientes de ambos os grupos de comparação. 5-12: genes provenientes do grupo I. 13-23: genes provenientes do grupo II. * indica os valores de *fold* referentes ao Grupo I. ' indica os valores de *fold* referentes ao Grupo II.

A seleção dos genes ocorreu com bases nos critérios estabelecidos, sendo que para o grupo I foram selecionados genes contidos, principalmente, em três vias: anti-apoptose, migração celular e adesão celular, representados no quadro 2.

Quadro 2. Apresentação dos genes pertencentes às vias de anti-apoptose, migração celular e adesão celular, segundo a ferramenta *ToppGene*.

Anti-apoptose		
TNFRS10D	IL6ST	THBS1
SON	ANXA1	DAPK1
SFRP1	BIRC3	GNAQ
SKP2	MCL1	DUSP1
CFLAR	FN1	NFKBIA
IKBKB	HSP90B1	
Migração celular		
ADAM9	KITLG	NRCAM
ADAM10	PLD1	ARD5B
PRKG1	CCDC88A	PDPN
SPAG9	CSF1	DPP4
IL6ST	MMP14	GNA13
ARHGAP5	TGFBR3	LAMA4
FN1	TGFB2	SEMA3C
MET	THBS1	
Adesão celular		
ADAM9	CSF1	THBS1
ADAM10	MMP14	BCL6
COL6A1	TGFBR3	DPP4
CCDC80	TGFB2	LAMA4

Destacados em negrito estão os genes selecionados para a validação por RT-PCR em tempo real.

Os genes induzidos pelo tratamento no grupo II selecionados para validação proveram principalmente das vias de cicatrização, apoptose e diferenciação celular (quadro 3A), e os genes inibidos pela ação do tratamento no grupo II foram selecionados também a partir da via da cicatrização (quadro 3B).

Quadro 3. Classificação em vias dos genes alterados pelo tratamento com 100 nM de vitamina D₃.

A.

Cicatrização		
TGFB2	LOX	CD14
TGFB3	PDPN	ZFP36
THBD	FOXF1	SPP1
SOD2	BCL2	NINJ1
IGF1	CD97	
Apoptose		
TGFB2	BCL2	OSR1
TGFB3	NFKBIA	SIX
EDNRB	SPP1	SOD2
DUSP1	EGFR	IGF1
TWIST2		
Diferenciação celular		
CCDC85B	TWIST2	SPP1
TGFB2	BCL2	CSF1
TGFB3	ZFP36	OSR1
FGF9	NFKBIA	FOXF1
SOD2	IGF1	SIX1

B.

Cicatrização	
NRG1	SERPINB2
WNT5A	F2RL2
F2R	

(A) Genes induzidos pelo tratamento. (B) Genes inibidos pelo tratamento. Os genes selecionados estão destacados em negrito.

4.10. RT-PCR em Tempo Real

4.10.1. Iniciadores

Dos 24 genes selecionados, oito já apresentavam iniciadores disponíveis no laboratório. As sequências, tamanho do amplificado, e temperatura de anelamento dos iniciadores estão especificados no Quadro 4. Os critérios estabelecidos para o desenho de iniciadores não puderam ser cumpridos, pois esses iniciadores foram sintetizados antes do estabelecimento dos mesmos.

Quadro 4. Características dos iniciadores já existentes no laboratório.

Gene	Tamanho do produto (pb)	Sequência	Tamanho do iniciador (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
CYP24A1	144	TAGACCTGAACGTTGGCTTC	20	52,54
		TATTTGCGGACAATCCAACA	20	49,85
TGFB2	94	GAGTGCCTGAACAACGGATT	20	52,72
		TTCACAACCTTTGCTGTCTGATG	21	51,70
SKP2	98	GCATGTGTCAGAGACCATCA	20	51,83
		GATTGGGGCATCTTCTAACTA	21	48,92
DUSP1	167	TTCCCGACGACACATATACA	20	50,31
		TGCTGAAAACAAACCTGCTT	20	50,85
G0S2	152	GAGAGGAGGAGAACGCTGAG	20	59,28
		ATCAGCTCCTGGACCGTTT	19	59,67
CD14	115	GCTCAGAGGTTTCGGAAGACT	20	53,3
		ATCGTCCAGCTCACAAGGTT	20	53,44
MAPK13	100	CTGGTCTGTGGGCTGTATCA	20	53,23
		CGGTCATTTTCAGGATCTGG	19	49,71
SERPINB2	74	ATAACACCTCCTGTGCCAGC	20	54,17
		GAAGTGTTCCACCAAGCCAT	20	52,54

Foram desenhados iniciadores correspondentes a outros 13 genes, demonstrados no Quadro 5. É possível observar que todos os iniciadores seguiram os critérios estabelecidos no laboratório, sendo que o tamanho de produto amplificado variou de 51 pb a 146 pb e temperatura de anelamento de todos os genes foi próxima a 60 °C. Além disso, todos os iniciadores apresentaram sequência intrônica extensa (> 1000 pb), e foi possível desenhar iniciadores bem próximos à extremidade 3' do transcrito-alvo.

Quadro 5. Características dos iniciadores desenhados.

Gene	Tamanho do produto (pb)	Sequência	Tamanho do iniciador (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
ANXA1	131	TCATCAAGCCATGAAAGGTG	20	59,65
		CTTGGCAAAGGGAGATACCA	20	60,07

DUSP4	156	ATAACCACAAGGCCGACATC	20	59,82
		CCCGTTTCTTCATCATCAGG	20	60,45
BIRC3	108	TGCAAGAAGCTGAAGCTGTG	20	60,47
		TCCGCAATTGTTCTTCCACT	20	60,64
MCL1	96	TAAGGACAAAACGGGACTGG	20	59,96
		CATTCTGATGCCACCTTCT	20	60,07
FN1	106	AATATCTCGGTGCCATTTGC	20	59,93
		GTAGTGCCTTCGGGACTGG	19	60,66
ADAM10	70	ATCCAAAGTTGCCTCCTCCT	20	60,07
		TGAATGGGCTGTGGAGGT	18	60,05
COL6A1	56	CAGATTACACCTGCCCCATC	20	60,34
		CAGCAGGATGGTGATGTCAG	20	60,27
SOD2	88	CGGGGACACTTACAAATTGC	20	60,37
		ACACATCAATCCCCAGCAGT	20	60,39
SULT1C2	51	AAGGAACTGTGGGGGATTG	19	59,76
		TCTCATTCTGGGCAACAGTG	20	59,83
IGF1	51	ACATGCCCAAGACCCAGA	18	60,05
		TCCCTCTACTTGCGTTCTTCA	21	60,00
F2RL2	119	TTTGCACTGCTGGCCTCCTG	21	59,91
		GGGGGAGCTCCACGAAAGGTCT	22	59,92
NRG1	135	AGGCATGCCAGAGAAACCCCTGA	23	59,86
		CGAAGGGGGCGATTGGGGG	20	59,76
C2F2RB	146	CCAGAACGGGAGCGCAGAGC	20	60,11
		GTGACACCTCGCTGTCCCCG	20	59,43

Não foi possível desenhar iniciadores para os genes SLC5A3 e THBD, pois esses genes possuem apenas um éxon codificante, o que impossibilita o desenho de iniciadores em éxons diferentes. Por essa razão, esses dois genes foram excluídos do grupo de validação.

O desenho dos iniciadores para o gene normalizador GAPDH utilizou os mesmos critérios descritos para os outros genes. O tamanho do amplificado para esse gene foi de 120 pb (sequência direta: 5'TGGTATCGTGGAAGGACTCA3'; sequência reversa: 5'GGGATGATGTTC TGGAGAGC 3').

4.10.2. PCR convencional

Após o desenho dos iniciadores foi realizada uma PCR convencional para verificar se todos os iniciadores amplificam seus fragmentos específicos na temperatura de pareamento de 60 °C, uma vez que esta é a temperatura sugerida na condição universal de termociclagem utilizada nos experimentos de RT-PCR em tempo real. Foram utilizados 20 ng de cDNAs das linhagens mamária normal HB4a e tumoral MCF-7, além de cDNA da amostra 13.FNAC. Todos os genes amplificaram bandas de tamanho esperado nesta temperatura.

4.10.3. Cálculo dos valores de eficiência dos iniciadores

Os valores das eficiências foram calculados através da fórmula citada no item 3.9, usando o coeficiente angular da equação da reta da curva padrão (*slope*). Realizamos o cálculo da eficiência para os genes de interesse, além do gene endógeno (GAPDH). Os valores de *slope* e da eficiência de cada gene estão representados no quadro 6. As reações foram feitas em duplicatas, sendo que duplicatas com valores de desvio padrão acima de 1 foram desconsideradas.

Quadro 6. Valores de eficiência dos iniciadores. Genes com seus respectivos valores de *slope* e eficiências calculadas.

Gene	<i>slope</i>	Eficiência
SKP2	-3,31875	1,00
ANXA1	-3,41432	0,96
DUSP1	-3,36530	0,98
DUSP4	-3,41056	0,96

BIRC3	-3,24318	1,03
MCL1	-3,24036	1,04
FN1	-3,39758	0,97
ADAM10	-3,41651	0,96
COL6A1	-3,36044	0,98
SOD2	-3,28740	1,01
G0S2	-3,23706	1,04
CD14	-3,19277	1,06
MAPK13	-3,16124	1,07
SERPINB2	-3,3452	0,99
CYP24A1	-3,19736	1,05
TGFB2	-3,35428	0,99
IGF1	-3,21660	1,05
SULTIC2	-3,12514	1,09
F2RL2	-3,20414	1,05
NRG1	-3,12654	1,09
CSF2RB	-3,37684	0,98
GAPDH	-3,21931	1,04

Todos os genes demonstraram apenas um pico na curva de dissociação, indicando que todas as reações apresentaram especificidade satisfatória. As eficiências dos iniciadores foram muito próximas de 1,0, que corresponde a uma eficiência de 100%, sendo que a variação foi de 0,96 a 1,07. Em conjunto, esses dados indicaram que todos os iniciadores foram eficientes na amplificação do transcrito-alvo.

4.10.4. Cálculo da medida de expressão relativa (ER)

Como a amplitude de variação dos valores de eficiência obtidos foi de 0.11, foi decidido utilizar o modelo proposto por Pffafli [87] para avaliar a

medida de expressão relativa (ER), pois este modelo leva em conta diferenças entre os valores de eficiência (figura 14).

Os valores de expressão relativa de cada uma das amostras dos grupos de tratamento e controle correspondente aos genes analisados pelo RT-PCR em tempo real estão representados nas tabelas 10 (genes provenientes do Grupo I) e 11 (genes provenientes do Grupo II), assim como o cálculo da razão entre as médias de ER das amostras do grupo de tratamento com VD₃ sobre a média de ER das amostras provenientes do grupo controle (R). O valor de R é resultado de uma rápida análise de média de expressão, sem qualquer significância estatística, utilizado simplesmente para verificar a tendência de comportamento da expressão dos genes após o tratamento com VD₃, ou seja, valores positivos indicam uma tendência de expressão aumentada após o tratamento, e valores negativos demonstram tendência de inibição do gene em questão após o tratamento com VD₃.

Tabela 10. Valores de expressão relativa das amostras para cada um dos genes provenientes do Grupo I.

Amostras		Genes										
Grupo	N#	SKP 2	ANXA 1	DUSP 4	BIRC 3	MCL1	FN1	ADA M10	COL6 A1	CYP24 A1	TGFB 2	DUSP1
CTRL	8	0,74	0,30	0,06	0,34	0,49	0,60	0,29	0,60	0,04	0,33	1,15
	9	0,37	0,47	0,34	0,32	0,70	0,48	0,23	0,48	0,14	0,18	1,05
	10	1,49	1,19	0,62	0,13	2,72	1,37	0,89	1,64	0,65	0,58	2,80
	11	0,22	0,14	3,16	0,20	0,40	0,49	0,17	0,57	0,04	0,08	1,35
	12	0,91	0,75	1,51	0,40	1,26	1,02	0,58	7,34	1,84	0,02	6,17
0,5 nM	8	0,52	0,16	0,10	0,48	0,49	0,54	0,20	0,44	26,17	0,53	0,88
	9	0,40	0,32	0,30	0,36	0,92	0,50	0,23	0,47	8,00	0,49	1,47
	10	1,32	1,18	0,85	0,27	2,79	1,48	1,51	2,06	22,47	1,42	8,71
	11	0,28	0,45	3,91	1,02	1,06	0,63	0,61	0,59	6,11	0,34	6,44
	12	0,76	0,47	1,32	0,16	0,66	0,88	0,36	5,64	21,40	0,02	1,40
R		0,88 [#]	0,90 [#]	1,14 [*]	1,64 [*]	1,06 [*]	1,01 [*]	1,35 [*]	0,86 [#]	31,22 [*]	2,37 [*]	1,51 [*]

Estão apresentados também na tabela os valores correspondentes à razão entre as médias de ER do grupo de tratamento 0,5 nM e do grupo controle. # Indica os genes cuja expressão apresentou tendência de inibição após o tratamento com 0,5 nM de VD₃. * Indica os genes cuja expressão apresentou tendência de indução após o mesmo tratamento.

Tabela 11. Valores de expressão relativa das amostras para cada um dos genes provenientes do Grupo II.

Amostras		Genes												
Grupo	N#	SOD 2	G0S 2	SULT 1C2	CD14	MAP K13	IGF 1	SERPI NB2	F2RL 2	NGR 1	CSF2 RB	CYP24A 1	TGFB 2	DUSP 1
CTRL	8	0,88	1,29	0,04	0,25	0,68	0,03	2,49	4,66	0,12	0,53	0,04	0,33	1,15
	9	0,43	0,57	0,03	0,10	0,46	0,01	84,15	0,44	0,10	0,61	0,14	0,18	1,05
	10	0,45	1,66	0,04	1,61	4,37	0,05	12,81	14,28	2,92	13,43	0,65	0,58	2,80
	11	0,28	0,11	0,01	0,13	0,49	0,22	3,87	0,45	1,02	5,06	0,04	0,08	1,35
	12	0,50	0,01	0,46	1,48	0,91	0,00	26,42	1,00	0,12	0,17	1,84	0,02	6,17
100 nM	8	0,77	10,51	1,24	4,55	3,00	0,07	0,74	1,40	0,04	0,16	1963,27	1,93	2,26
	9	0,68	11,58	1,27	1,70	2,98	0,03	0,39	0,43	0,04	0,35	2203,95	1,73	2,18
	10	0,54	5,84	5,25	15,75	31,89	0,22	2,88	2,68	0,65	3,44	11744,6	2,88	0,54
	11	0,40	0,33	5,42	1,64	8,12	0,63	5,71	0,28	0,30	1,76	3715,77	1,39	5,33
	12	0,40	0,14	30,56	2,55	2,61	0,00	8,70	0,99	0,06	0,08	2087,05	0,08	1,69
R		1,10*	7,81*	76,14*	7,32*	7,03*	3,12*	0,14 [#]	0,28 [#]	0,26 [#]	0,29 [#]	8056,71*	6,73*	0,96 [#]

Estão apresentados também na tabela os valores correspondentes à razão entre as médias de ER do grupo de tratamento 100 nM e do grupo controle. # Indica os genes cuja expressão apresentou tendência de inibição após o tratamento com 100 nM de VD₃. * Indica os genes cuja expressão apresentou tendência de indução após o mesmo tratamento.

4.10.5. Determinação das diferenças de expressão entre as amostras do grupo controle e as amostras tratadas com VD₃

As diferenças de expressão de cada gene nos grupos controle e de tratamento foram determinadas utilizando o programa computacional *SPSS*.

O primeiro passo foi transformar os valores de ER em logaritmo natural. Posteriormente a distribuição desses dados foi estudada utilizando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Conforme descrito em Material e

Métodos, esse método caracteriza uma distribuição como não-Normal quando o p -valor é menor que 0,05. Os valores de ER das cinco amostras do grupo controle e das cinco amostras dos grupos de tratamento foram analisados separadamente. Assim, cada gene obteve dois valores de p , um referente à distribuição das amostras do grupo controle, e outro referente à distribuição das amostras do grupo de tratamento. Foram considerados genes com distribuição Normal aqueles cujas análises resultaram em ambos os valores de p maiores que 0,05.

Conforme demonstrado na tabela 12, com exceção do gene TGFB2, todos os outros genes possuem dados com distribuição Normal, possibilitando a utilização de métodos estatísticos paramétricos para análises de diferença de expressão. O método utilizado nesses casos foi T-Student, e o método não-paramétrico utilizado para análise do gene TGFB2 foi o teste de Wilcoxon.

Tabela 12. Teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Gene	Grupo	W	p	Gene	Grupo	W	p
SKP2	CTRL	0,970	0,875	CD14	CTRL	0,832	0,144
	0,5 nM	0,986	0,963		100 nM	0,859	0,225
ANXA1	CTRL	0,988	0,972	MAPK13	CTRL	0,795	0,074
	0,5 nM	0,968	0,860		100 nM	0,801	0,082
DUSP4	CTRL	0,973	0,894	IGF1	CTRL	0,966	0,852
	0,5 nM	0,989	0,975		100 nM	0,976	0,912
BIRC3	CTRL	0,899	0,402	SERPINB2	CTRL	0,962	0,819
	0,5 nM	0,989	0,977		100 nM	0,929	0,586
MCL1	CTRL	0,935	0,630	F2RL2	CTRL	0,878	0,301
	0,5 nM	0,927	0,574		100 nM	0,970	0,873
FN1	CTRL	0,865	0,248	NGR1	CTRL	0,800	0,082
	0,5 nM	0,893	0,371		100 nM	0,839	0,161
ADAM10	CTRL	0,945	0,699	CSF2RB	CTRL	0,927	0,574
	0,5 nM	0,945	0,699		100 nM	0,940	0,668
COL6A1	CTRL	0,813	0,102	CYP24A1	CTRL	0,903	0,427
	0,5 nM	0,837	0,157		0,5 nM	0,825	0,128
SOD2	CTRL	0,941	0,671		100 nM	0,778	0,053
	100 nM	0,890	0,355	TGFB2	CTRL	0,960	0,806
G0S2	CTRL	0,884	0,326		0,5 nM	0,848	0,187
	100 nM	0,821	0,118		100 nM	0,725	0,017
SULT1C2	CTRL	0,918	0,515	DUSP1	CTRL	0,858	0,223
	100 nM	0,883	0,321		0,5 nM	0,860	0,227
					100 nM	0,935	0,632

W: estatística calculada pelo teste. *p*: corresponde ao *p*-value de cada grupo de amostras. A linha em negrito corresponde ao único grupo de amostras cuja análise resultou em *p*-value<0,05, indicando que essas amostras não seguem uma distribuição Normal de dados.

Para calcular a expressão relativa dos genes com distribuição Normal, foi aplicado o teste T-Student pareado, e para aquele que não apresentou distribuição Normal, foi utilizado o teste de Wilcoxon. Foram considerados como diferentemente expressos após o tratamento com VD₃ os genes que apresentaram *p*<0,05.

O teste T-Student pareado analisa a diferença entre as médias de duas populações, disponibilizando um valor estatístico t e uma significância (p -value) para esta estatística. O valor estatístico t foi resultado da média do grupo controle subtraída da média do grupo de tratamento (CTRL – VD₃). Assim, os genes que apresentaram valores positivos de t foram inibidos pelo tratamento com VD₃. Da mesma forma, genes com valores negativos de t foram induzidos pelo tratamento com VD₃. Para o teste de Wilcoxon, que fornece uma estatística z , valores negativos também indicam indução após o tratamento.

Os resultados dos testes estatísticos empregados para determinar as diferenças de expressão de cada gene após o tratamento com VD₃ estão demonstrados na figura 29. O gráfico mostra a distribuição de todos os valores entre as barras, com exceção de *outliers* e valores extremos.

Dentre os genes provenientes do Grupo I de comparação, ANXA1, COL6A1 e SKP2, ao contrário do esperado, apresentaram uma tendência a diminuição de expressão após o tratamento com 0,5 nM de VD₃, mas sem significância estatística. Já os genes ADAM10, BIRC3, DUSP4, FN1 e MCL1 demonstraram uma tendência a aumento de expressão após o mesmo tratamento, porém, mais uma vez, não houve significância estatística.

Figura 29. Expressão relativa dos genes avaliados por RT-PCR em tempo real nas amostras controles e tratadas com VD₃. O gráfico mostra as diferenças de expressão de cada gene nas amostras controles e nas amostras tratadas com VD₃. *t*: estatística resultante do teste T-Student pareado. *z*: estatística resultante do teste de Wilcoxon. *p*: valor de significância de cada análise.

Entre os genes selecionados a partir do Grupo II, a expressão dos genes CD14, G0S2, IGF1, MAPK13 e SULT1C2 foi induzida pelo tratamento com

100 nM de VD₃, com significância estatística. O gene SOD2 demonstrou aumento de expressão após o tratamento, mas sem significância estatística.

Os genes CSF2RB e NRG1 foram comprovadamente inibidos pela VD₃, e os genes F2RL2 e SERPINB2 apresentaram também inibição após o tratamento, porém sem comprovação estatística.

Entre os três genes selecionados a partir dos dois grupos de tratamento, tanto o gene CYP24A1 quanto o TGFB2 foram comprovadamente induzidos pelas duas concentrações de VD₃. Para o gene DUSP1 o tratamento com 0,5nM de VD₃ resultou em aumento de sua expressão, e o tratamento com 100nM resultou em diminuição, porém não houve significância estatística em nenhum destes dois resultados.

4.11. Correlação entre os dados resultantes das técnicas de oligo *microarray* e RT-PCR em tempo real

Após as análises dos dados obtidos pela técnica de RT-PCR em tempo real para os genes selecionados, verificamos se ocorreu correlação entre os valores de expressão relativa normalizada resultantes obtidos e os valores de expressão obtidos pela metodologia de oligo *microarray*. A análise de correlação foi realizada pelos testes: (1) correlação linear de Pearson (paramétrico) e (2) Spearman (não-paramétrico). Os parâmetros utilizados para determinar a força da correlação foram especificados anteriormente no item 3.9.i.

Tabela 13. Correlação entre os dados obtidos pelas metodologias de *microarray* e RT-PCR em tempo real dos genes provenientes do Grupo I.

Genes	CTRL		0,5 nM	
	ρ	p	ρ	p
SKP2	0,697	0,191	0,560	0,326
ANXA1	0,846	0,071	0,496	0,396
DUSP4	0,042	0,947	0,780	0,119
BIRC3	0,497	0,394	0,678	0,209
MCL1	0,431	0,468	0,423	0,478
FN1	0,421	0,480	0,280	0,649
ADAM10	0,446	0,452	0,683	0,204
COL6A1	0,545	0,342	0,827	0,084
CYP24A1	0,263	0,669	0,529	0,359
TGFB2	0,662	0,223	0,721	0,170
DUSP1	-0,129	0,836	0,189	0,761

ρ : coeficiente de correlação de Pearson. p : valor de significância de cada análise.

As análises de correlação entre os dados obtidos pelas duas metodologias de quantificação de RNAm demonstraram correlação positiva em ambos os grupos de todos os genes, exceto no grupo controle do gene DUSP1, que apresentou fraca correlação negativa. Em todos os casos não houve significância estatística.

Tabela 14. Correlação entre os dados obtidos pelas metodologias de *microarray* e RT-PCR em tempo real dos genes provenientes do Grupo II.

Genes	CTRL		100 nM	
	ρ	p	ρ	p
SOD2	0,014	0,982	0,832	0,081
G0S2	0,929	0,022	0,984	0,002
SULT1C2	0,375	0,534	0,967	0,007
CD14	0,939	0,018	0,784	0,117
MAPK13	0,971	0,006	0,967	0,007
IGF1	0,803	0,102	0,954	0,012
SERPINB2	0,942	0,017	-0,150	0,810
F2RL2	0,939	0,018	0,731	0,161
NGR1	0,673	0,213	0,608	0,276
CSF2RB	0,914	0,030	0,842	0,073
CYP24A1	0,263	0,669	0,457	0,439
TGFB2	0,400*	0,505	1,000*	0,001
DUSP1	-0,129	0,836	-0,997	0,001

ρ : coeficiente de correlação de Pearson. r^* : coeficiente de correlação de Spearman. p : valor de significância de cada análise. Em negrito estão destacados os valores que apresentaram significância estatística.

Os valores obtidos pelas duas técnicas de quantificação de RNAm apresentaram coeficientes de correlação significativamente positivos para os genes G0S2, SULT1C2 (grupo tratado), CD14 (grupo controle), MAPK13, IGF1 (grupo tratado), SERPINB2 (grupo controle), F2RL2 (grupo controle), CSF2RB e TGFB2 (grupo tratado, com correlação positiva perfeita), e significativamente negativo para o grupo tratado do gene DUSP1.

Tendência de correlação positiva foi verificada para a expressão dos outros genes em ambos os grupos, exceto para o grupo tratado do gene SERPINB2.

5. DISCUSSÃO

A função de supressão tumoral que a vitamina D exerce em diversos tipos de tumores é bem descrita na literatura e é decorrente dos importantes papéis que a VD_3 exerce na regulação de genes envolvidos em diversos processos biológicos, tais como proliferação, diferenciação e morte celulares [24, 25, 29, 31 - 36], além de modulação do processo inflamatório e de cicatrização [37, 106, 107].

No câncer de mama, os efeitos antiproliferativos deste hormônio foram demonstrados tanto em linhagens epiteliais mamárias humanas como em modelos animais [108 - 110].

A presença de VDR (receptor de vitamina D) em células epiteliais mamárias e em células cancerosas [23, 111], somada aos efeitos antiproliferativos da VD_3 abriram perspectivas para o uso deste hormônio na prevenção e no tratamento de carcinomas mamários [8], levando ao estabelecimento de certo número de ensaios clínicos testando a eficiência da $1,25D$ ou análogos sintéticos [8]. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais a VD_3 exerce seus efeitos antiproliferativos permanecem poucos claros.

O câncer de mama é um “órgão complexo”, composto por células epiteliais cancerosas e pelo componente estromal. Dentre as células estromais, destacam-se os fibroblastos, os maiores constituintes do estroma tumoral e responsáveis tanto pela composição do estroma quanto pela homeostase do mesmo e do tecido como um todo [57 - 63]. A desregulação

de vias de sinalização envolvidas na comunicação entre fibroblastos associados ao câncer (FACs) e células mamárias tumorais pode levar ao crescimento das células epiteliais tumorais tanto *in vitro* [48, 49] quanto *in vivo* [45].

Além de descrever o papel dos FACs nas etapas de iniciação e progressão tumoral [112, 63], estudos recentes demonstraram que a atividade funcional dos FACs é um determinante importante para o comportamento clínico desses tumores, e que o perfil de expressão gênica estromal possui importante valor prognóstico [113] e é capaz de modular a resposta à quimioterapia. Tais dados indicam que a análise do perfil de expressão gênica apresentado por FACs em resposta ao tratamento antitumoral é importante para um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta do câncer de mama a diferentes terapias. A contribuição das células estromais para a resposta ao tratamento com vitamina D em câncer de mama não foi ainda analisada. Dados limitados da resposta ao tratamento com VD₃ foram publicados utilizando fibroblastos embrionários murinos [114].

No presente estudo, foi utilizada a metodologia de oligo *microarray* para elucidar mudanças no perfil gênico após o tratamento de fibroblastos associados ao câncer de mama com 0,5 e 100 nM de VD₃. Embora diversos estudos tenham demonstrado as mudanças de expressão gênica após o tratamento com VD₃ em células de diversas neoplasias, dentre eles câncer de mama, nosso estudo é único, pois relata o efeito da VD₃ em modelo de cultura primária de fibroblastos associados ao câncer de mama. Foram

utilizados fibroblastos provenientes de cinco amostras de câncer de mama ductal invasivo, estabelecidos em cultura e identificado pela expressão de marcadores associados a esse tipo celular.

Primeiramente foi verificado a presença de receptores de VD nas populações de fibroblastos derivadas das cinco amostras incluídas neste estudo. Para isso, foram realizados ensaios de imunofluorescência seguidos por análise em microscópio confocal e os resultados demonstraram a presença desses receptores em todas as populações de FACs.

Ensaio de Citometria de Fluxo demonstraram que não ocorre inibição de crescimento de fibroblastos associados ao câncer de mama, independente da concentração de VD₃ utilizada no tratamento.

Vários autores demonstraram inibição de proliferação de células cancerosas epiteliais de mama [20, 24 – 28] e também em células de origem mesenquimal [115, 116], porém nestes casos as células foram incubadas com 100 nM de VD₃ durante pelo menos quatro dias, sugerindo assim que tratamentos realizados em períodos maiores que 24 horas seriam necessários para demonstrar diferenças de proliferação.

Embora com o uso da metodologia de Citometria de Fluxo não tenha sido possível demonstrar relação entre a vitamina D e o processo de proliferação celular, análises de expressão de RNAm no presente estudo demonstraram ocorrer indução de expressão de alguns genes relacionados à proliferação após a adição de VD₃ às culturas de fibroblastos. Um exemplo é o gene MAPK13 ou p38δ, cuja expressão foi associada à inibição de proliferação celular [117].

Experimentos de RT-PCR em tempo real realizados para confirmar os resultados obtidos pela metodologia de *microarray* após as análises dos dados gerados pelas amostras tratadas com 0,5 nM de VD₃ confirmaram estatisticamente a indução dos genes CYP24A1 e TGFB2. Os genes ADAM10, BIRC3, DUSP1, DUSP4, FN1 e MCL1 demonstraram tendência de indução após o tratamento com 0,5 nM de VD₃, porém sem significado estatístico. Ao contrário do observado pela metodologia de *microarray*, os genes ANXA1, COL6A1 e SKP2 demonstraram uma tendência de inibição pela ação da VD₃, também sem significado estatístico.

Portanto, apesar das análises de *microarray* demonstrarem que 0,5 nM de VD₃ induziu a expressão de diversos genes, essa indução não pode ser validada pelas análises posteriores. Uma possível explicação para o ocorrido seria que as diferenças entre o grupo controle e o grupo tratado sejam pequenas, ou seja, devido aos baixos valores de *fold*, uma vez que genes com valores maiores de *fold*, como os genes CYP24A1 e TGFB2, puderam ser validados. Esses resultados não excluem a possibilidade de ocorrerem, dentre os genes não analisados, genes cuja expressão tenha sido de fato induzida pela ação da VD₃.

A modulação de 24-hidroxilase foi a indução de maior magnitude dentre todos os genes positivamente regulados pela ação da VD₃ em ambas as concentrações utilizadas neste estudo, indicando que estes fibroblastos contém VDR funcional. Estudos comprovam que vitamina D induz o gene da CYP24A1 [118, 119], que codifica um membro da superfamília de enzimas citocromo p450. Sua regulação pela VD₃ é importante para manter a

homeostase de vitamina D, já que esta proteína mitocondrial inicia a degradação de VD_3 . Expressão elevada de CYP24A1 foi descrita em vários tumores e alguns estudos descrevem sua amplificação em câncer de mama [120]. Comparada à MCF-7, os níveis de CYP24A1 são cem vezes maiores em MDA-MD-231, células resistentes aos efeitos antiproliferativos da VD_3 [121]. Portanto a superexpressão de CYP24A1 em FACs pode diminuir o controle do crescimento mediado pela 1,25D.

O gene que codifica a proteína antiapoptótica bcl2 apresentou níveis de expressão aumentados segundo as análises de *microarray*, em contraste com dados da literatura que sugerem que VD_3 induz apoptose em vários tipos de câncer, incluindo carcinomas de mama [122], embora os mecanismos envolvidos ainda não sejam claros. Em células mesenquimais, 1,25D promove a indução de marcadores antiapoptóticos, incluindo BCL2 [115]. A expressão de BCL2 em câncer de mama está associada a fenótipos de baixo-grau e proliferação reduzida [123]. Expressão aumentada da proteína BCL2 pode também romper o balanço com outros membros da família BCL2, incluindo a expressão de proteínas pró-apoptóticas [124]. Foi demonstrado que o produto protéico do gene G0S2, que foi comprovadamente induzido pelo tratamento com VD_3 , interage com BCL2 e promove a apoptose por impossibilitar a formação de heterodímeros BCL2/BAX [125]. Além disso, foi demonstrado pelo mesmo estudo que G0S2 induz apoptose em diversas linhagens celulares de cânceres humanos nas quais este gene está normalmente silenciado epigeneticamente.

Dentre os genes induzidos pela VD₃ pertencentes à família Rho de pequenas proteínas ligantes de GTP (que por sua vez pertence à super-família Ras) estão RHOU, RHOJ e RGNEF.

Vinte e duas Rho GTPases já foram identificadas em humanos [126]. São moléculas reguladoras da conversão GDP/GTP que regulam vias de sinalização, controlando diversos processos celulares, incluindo regulação do citoesqueleto, adesão celular, polarização celular, atividade transcricional, apoptose e migração celular [127, 128]. Essas proteínas ciclam entre uma forma ativa, que interage com alvos *downstream*, e a forma inativa, com uma conformação GDP [127, 128].

Foi bem estabelecido que as Rho GTPases funcionam como reguladores do citoesqueleto de actina, pois várias dessas proteínas atuam como moléculas de sinalização, agindo via receptores transmembranares e assim exercendo efeitos sobre o citoesqueleto de actina [129].

RHOU, também conhecido como Wrch-1 é um importante gene regulador de adesão focal e o aumento de sua expressão foi associado ao aumento de migração celular [130]. Além disso, Rhou estimula células quiescentes a reiniciar o ciclo celular [131]. Até o presente momento, não temos explicação para a indução de expressão deste gene como resultado da ação da 1,25D. Por outro lado, outros membros dessa família (RHOUJ) estão aparentemente associados a uma maior adesão focal [132]. Não foram ainda realizados ensaios de motilidade para validar funcionalmente esses dados.

RAB9B, RASSF2A e RASSF5 são genes pertencentes à super-família Ras e identificados por nossas análises como induzidos pela VD₃.

RASSF2A exibe várias propriedades supressoras tumorais, como inibição da proliferação celular e indução de apoptose [133, 134]. Pacientes que possuem o promotor deste gene metilado, apresentam uma alta frequência de metástase linfonodal [133].

Estudos sugerem que o gene RASSF5 codifica uma proteína do citoesqueleto com atividades de inibição de crescimento e de supressão de tumor, decorrentes da inibição da via de sinalização de ERK [135].

TGFB2 foi outro gene encontrado induzido após as duas condições de tratamento pela metodologia de *microarray*, e cuja expressão foi confirmada pelos experimentos posteriores de validação.

Transforming growth factor beta (TGFB) é um ligante que está intimamente associado à regulação da iniciação tumoral, progressão e metástase [136]. A regulação da tumorigênese exercida pela sinalização de TGFB esta relacionada à sua habilidade em regular o comportamento do tumor e dos constituintes do estroma tumoral [137].

Indução de TGFB2 pela VD₃ ocorre em vários tipos celulares [138, 122]. Foi demonstrado que a VD₃ regula TGFB2 em células epiteliais tumorais mamárias (MCF-7 e MCF-12A), porém não em células epiteliais tumorais mamárias resistentes à VD₃ (MCF-7_{Res}). Além disso, o co-tratamento de MCF-7_{Res} com TGFB2 e VD₃ aumenta os efeitos antiproliferativos e transcricionais relacionados ao VDR [139].

Uma função importante que este ligante exerce no microambiente tumoral é promover a supressão imune ao estimular o recrutamento de monócitos, macrófagos, células NK e células T [140].

Vários genes relacionados à resposta imune, inflamação e cicatrização tiveram sua expressão aumentada, tais como CD14, TREM-1, IL1RL1, PDPN, THBD, HS3ST1 e CD97. Outros tiveram sua expressão reduzida após o tratamento com VD₃. Alguns deles são: F2RL2, ADK, F2R, NGR1 e CSF2RB.

A proteína originada a partir do gene CD14 corresponde a um antígeno de superfície, preferencialmente expressado em monócitos e macrófagos. Muitos trabalhos científicos associam vitamina D ao marcador de diferenciação CD14 [141, 142], e outros demonstram o papel desse gene no processo inflamatório [143, 144]. Essa associação é confirmada pela presença de VDREs no promotor deste gene, caracterizando assim o gene CD14 como responsivo à VD₃ [145].

Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) induz monócitos/macrófagos e neutrófilos e acelera a destruição celular ao programar a resposta inflamatória em doenças relacionadas por infecções bacterianas. Apesar de ainda não ser clara a ação deste gene em doenças não-microbianas, estudos sugerem que TREM-1 possa contribuir para o desenvolvimento do processo inflamatório também nesses tipos de doenças ao induzir citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e a degranulação rápida de neutrófilos [146, 147].

A proteína codificada pelo gene IL1RL1 é um membro da família de receptores de interleucina I. Estudos em camundongos sugerem que este receptor pode ser induzido por estímulos inflamatórios, e pode estar envolvido na função de células do sistema imune. Foi demonstrado que este gene é responsivo à VD₃, pois apresenta VDREs em seu promotor [145].

O gene CSF2RB ou GM-CSF (*Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*) codifica um receptor com alta afinidade por IL-3, IL-5 e CSF. É um importante mediador de inflamação, e apresentam um papel crítico na função dos macrófagos alveolares [148]. Clinicamente, GM-CSF é utilizado como estimulador da resposta imune, sendo utilizado com adjuvante de vacinas em pacientes com câncer [149].

ADK é uma adenosina quinase cuja função é catalisar a transferência de gama-fosfato de ATP para a adenosina. A inibição de ADK pode desempenhar um importante papel no aumento da concentração de adenosina intravascular, agindo assim como um agente antiinflamatório.

A expressão do fator de crescimento IGF1 esta relacionada à promoção de proliferação celular e a inibição de apoptose em inúmeros tipos de tecidos [150]. O resultado dos ensaios de Citometria de Fluxo demonstrou não ocorrer diferença de proliferação após o tratamento da VD₃, o que nos leva a crer que a expressão aumentada de IGF1 após a adição de VD₃ possa desempenhar um papel em outro processo biológico no FAC. Uma possibilidade seria que a indução de IGF1 resultaria em redução da resposta imune e/ou supressão do estresse oxidativo, uma vez que foi

demonstrado que o aumento de IGF1 circulante reduz a resposta inflamatória vascular e o estresse oxidante vascular e sistêmico [151].

A importância exercida pela resposta imune e inflamatória é demonstrada no trabalho do grupo de Liao *et al* (2009), cujos achados demonstraram que fibroblastos associados ao câncer promovem crescimento tumoral e metástase devido ao seu papel como chave moduladora da polarização imune do microambiente tumoral [152]. Os inúmeros genes presentes na via de sinalização das respostas imune e inflamatória indicam que a resposta ao tratamento com VD₃ se configura como uma resposta antiinflamatória.

Moléculas de adesão celular foram encontradas com expressão alterada pelo tratamento com VD₃. Dentre os genes dessa classe com expressão induzida, encontra-se um gene codificante de colágeno. COL16A1, frequentemente encontrado em fibroblastos, exerce papel importante na manutenção da integridade da matriz extracelular.

Dentre os genes com expressão inibida pela vitamina D, encontra-se o gene HAS2, cuja expressão esta relacionada a um fenótipo mais invasivo da célula cancerosa de tumor de mama [153, 154]. Este fenótipo mais agressivo deve-se ao papel que HAS2 exerce no crescimento celular e, principalmente, na adesão celular [155]. AMIGO2 é outro gene relacionado à adesão celular inibido pela VD₃. Trata-se de uma molécula de adesão cuja expressão foi associada à instabilidade cromossomal e a diminuição da adesão celular e conseqüentemente, aumento de migração em camundongos com adenocarcinomas gástricos [156].

A ação da VD₃ inibiu a expressão de genes relacionados à indução de migração das células neoplásicas, como o gene PTPRB ou VE-PTP (*Vascular endothelial-protein tyrosine phosphatase*), um receptor tipo proteína fosfatase expresso especificamente em células endoteliais e está relacionado à regulação da angiogênese. Sua expressão promove migração de fibroblastos em cultura, além de regular a migração de células endoteliais durante a angiogênese [157].

Genes relacionados a apoptose (PHF17, TMEM166 e IER3), a ciclo celular (WNT5A) e a proliferação celular (PDGFC) tiveram suas expressões diminuídas após o tratamento com 100 nM de VD₃.

PDGFC ou *Platelet-derived growth factor C* pertence a uma família de fatores de crescimento para células de origem mesenquimal. Este gene participa da via parácrina de sinalização que acelera o crescimento tumoral ao induzir o recrutamento e a proliferação de FACs em melanomas malignos [158].

Além dos processos biológicos já citados, genes associados a outros processos também tiveram sua expressão alterada pela ação do tratamento com 100 nM de VD₃. Um exemplo foi a ativação de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos (SULT1C2, NPC1, MALL e AKR1C2). A VD₃ ativou ainda genes envolvidos em vias de transporte (SLC5A3, SLC1A1, MFI2 e STAU2) e também em canal de potássio (KCNE4). Um exemplo de inibição de genes após o tratamento que merece menção é a redução da expressão de genes relacionados ao processo transcricional, que desempenha papel importante no processo tumorigênico. O tratamento com VD₃ acarretou em

diminuição da expressão de ativadores da atividade transcricional, como os genes MYBL1, EID3, E2F7 e RGS4.

Entre os genes que exibiram expressão alterada pela vitamina D, vários grupos funcionais foram identificados. Interessantemente, muitos dos genes alterados foram previamente relatados em outros estudos utilizando células epiteliais mamárias normais ou tumorigênicas, tais como: CYP24A1, CD14, CYP26B1, DUSP10, CASK, COL16A1, GEM, GPRC5B, MTSS1, NRG1, CD97, TREM1, ZFP36, TGFB2, CLMN, THBS1, SPP1, MYBL1, FN1, NGR1, G0S2, DUSP1, EGFR, FGF9, RAB5A, THBD, I1RL1 [139, 144, 159, 160].

Estes estudos não apenas validam nossos resultados, como também suportam a utilidade desses genes como marcadores da ação da vitamina D.

Muitos desses genes são sabidamente alvos da VD_3 , pois apresentam VDRE em seus promotores (CYP24A1, TGFB2, EGFR, osteopontina, osteocalcina, CD14, SERPINB1, I1RL1) [145, 159]. Adicionalmente, respostas rápidas que não são dependentes de VDREs poderiam ser dependentes de receptores de membrana previamente descritos [161]. Foi demonstrado que a expressão desses receptores, denominados 1,25D3-MARRS (*membrane-associated, rapid response steroid-binding*) e também conhecidos como ERp57/GRp58, interfere com a atividade inibitória de crescimento da VD_3 em células tumorais mamárias, comprovando que esses receptores exercem função semelhante a exercida pelo VDR [161].

Em resumo, nós demonstramos a presença de receptores de vitamina D em culturas primárias de fibroblastos provenientes de cinco amostras de

cânceres de mama ductais invasivos. Foi verificado por ensaios de citometria de fluxo que não ocorreu parada de ciclo celular dos FACs após tratamento de 24 horas com VD₃. Posteriormente, foram identificados perfis de expressão gênica diferentes entre FACs submetidos ao tratamento com VD₃ e FACs provenientes das amostras controles. Além disso, foram encontradas diferenças de perfil gênico entre os FACs tratados com 0,5nM e os tratados com 100 nM.

Os resultados deste estudo indicam que a VD₃ apresenta papel regulador do microambiente, pois modula genes relacionados a vias de apoptose, diferenciação, adesão e resposta inflamatória, entre outras. Desta forma, a VD₃ pode auxiliar na prevenção tumoral, além de agir na contenção da progressão do tumor de mama.

6. CONCLUSÃO

Culturas primárias de fibroblastos provenientes de amostras de tecidos tumorais de mama puderam ser estabelecidas, uma vez que ensaios de imunofluorescência confirmaram a homogeneidade desta cultura.

Foi demonstrada também por experimentos de imunofluorescência a expressão de receptores de vitamina D em todas as culturas primárias de FACs.

A comparação entre as análises de expressão gênica dos FACs provenientes de dois grupos de tratamento com vitamina D₃ e a análise de expressão gênica dos FACs provenientes do grupo não-tratado identificou diferenças entre os perfis gênicos destes grupos, demonstrando haver influência da ação da vitamina D neste tipo celular. Dentre os genes diferentemente expressos entre os grupos de tratamento e grupo controle estão genes principalmente relacionados ao sistema imune e resposta inflamatória, ao mecanismo da adesão focal (família Ras), à regulação da apoptose e ao metabolismo de cálcio.

Muitos desses genes diferentemente expressos puderam ser validados pela técnica de RT-PCR em tempo real, comprovando assim que fibroblastos associados ao câncer de mama respondem à vitamina D através da regulação de vias envolvidas no processo tumorigênico.

7. ANEXOS

Anexo A. Tabela de genes *up-regulados* após tratamento com 0,5 nM de VD₃.

<i>Probe Set ID</i>	<i>Gene Title</i>	<i>Gene Symbol</i>	<i>Fold</i>
206504_at	CYP24A1	cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	6,7010
204014_at	DUSP4	dual specificity phosphatase 4	2,4581
209908_s_at	TGFB2	transforming growth factor, beta 2	2,2409
243296_at	PBEF1	Pre-B-cell colony enhancing factor 1	2,1969
213164_at	SLC5A3	solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3	2,1805
227260_at	ANKRD10	Ankyrin repeat domain 10	2,1360
233011_at	ANXA1	Annexin A1	1,9988
1557167_at	HCG11	HLA complex group 11	1,9840
1554029_a_at	KIAA0372	KIAA0372	1,9738
209909_s_at	TGFB2	transforming growth factor, beta 2	1,9696
219872_at	C4orf18	chromosome 4 open reading frame 18	1,9301
243495_s_at	NA	MRNA; cDNA DKFZp686E18224 (from clone DKFZp686E18224)	1,9152
220407_s_at	TGFB2	transforming growth factor, beta 2	1,8917
239178_at	FGF9	fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	1,8893
224828_at	CPEB4	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4	1,8774
225956_at	LOC153222	adult retina protein	1,8599
218973_at	EFTUD1	elongation factor Tu GTP binding domain containing 1	1,8517
223542_at	ANKRD32	ankyrin repeat domain 32	1,8435
1557459_at	NA	MRNA; cDNA DKFZp547O0210 (from clone DKFZp547O0210)	1,8390
233614_at	NA	CDNA FLJ11661 fis, clone HEMBA1004617	1,8372
205539_at	AVIL	advillin	1,8351
203788_s_at	SEMA3C	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	1,8266
212105_s_at	DHX9	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	1,8261
212940_at	COL6A1	collagen, type VI, alpha 1	1,8217
1555564_a_at	CFI	complement factor I	1,8204
207119_at	PRKG1	protein kinase, cGMP-dependent, type I	1,8196
205808_at	ASPH	aspartate beta-hydroxylase	1,8186
210567_s_at	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	1,8050
208664_s_at	TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3	1,7965
232431_at	NA	Glucocorticoid receptor alpha mRNA, variant 3' UTR	1,7853
209257_s_at	SMC3	structural maintenance of chromosomes 3	1,7820
221618_s_at	LOC728198 TAF9B	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa similar to transcription associated factor 9B	1,7773
208663_s_at	TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3	1,7685
211081_s_at	MAP4K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5	1,7681
1555167_s_at	PBEF1	pre-B-cell colony enhancing factor 1	1,7421
214701_s_at	FN1	fibronectin 1	1,7410
226926_at	DMKN	dermokine	1,7354
244455_at	KCNT2	potassium channel, subfamily T, member 2	1,7335
232113_at	NA	CDNA FLJ38472 fis, clone FEBRA2022148	1,7325
238419_at	PHLDB2	pleckstrin homology-like domain, family B, member 2	1,7293
233364_s_at	NA	CDNA FLJ38472 fis, clone FEBRA2022148	1,7275

238562_at	NA	Full-length cDNA clone CS0DI039YF12 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens (human)	1,7239
226310_at	RICTOR	rapamycin-insensitive companion of mTOR	1,7235
216109_at	THRAP2	Thyroid hormone receptor associated protein 2	1,7227
214895_s_at	ADAM10	ADAM metalloproteinase domain 10	1,7196
206757_at	PDE5A	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	1,7140
236207_at	SSFA2	sperm specific antigen 2	1,7119
221220_s_at	SCYL2	SCY1-like 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	1,7071
1554132_a_at	KIAA1128	KIAA1128	1,7064
200841_s_at	EPRS	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	1,7063
212634_at	KIAA0776	KIAA0776	1,7041
1554339_a_at	COG3	component of oligomeric golgi complex 3	1,7028
1555733_s_at	AP1S3	adaptor-related protein complex 1, sigma 3 subunit	1,7001
1552627_a_at	ARHGAP5	Rho GTPase activating protein 5	1,6973
216915_s_at	PTPN12	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	1,6948
235008_at	NA	CDNA FLJ25241 fis, clone STM02689	1,6897
219696_at	C1orf218	chromosome 1 open reading frame 218	1,6891
202208_s_at	ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	1,6889
219228_at	ZNF331	zinc finger protein 331	1,6863
222798_at	PTER	phosphotriesterase related	1,6857
215723_s_at	PLD1	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific	1,6802
211019_s_at	LSS	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)	1,6776
226115_at	AHCTF1	AT hook containing transcription factor 1	1,6771
240383_at	UBE2D3	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	1,6703
224046_s_at	PDE7A	phosphodiesterase 7A	1,6691
201044_x_at	DUSP1	dual specificity phosphatase 1	1,6681
237215_s_at	TFRC	transferrin receptor (p90, CD71)	1,6673
212937_s_at	COL6A1	collagen, type VI, alpha 1	1,6642
1565347_s_at	TFE3	transcription factor binding to IGHE enhancer 3	1,6609
210932_s_at	RNF6	ring finger protein (C3H2C3 type) 6	1,6607
207233_s_at	MITF	microphthalmia-associated transcription factor	1,6585
217208_s_at	DLG1	discs, large homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	1,6522
201831_s_at	VDP	vesicle docking protein p115	1,6502
211090_s_at	PRPF4B	PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog B (yeast)	1,6465
231274_s_at	SLC25A37	Solute carrier family 25, member 37	1,6429
236922_at	NA	CDNA FLJ38215 fis, clone FCBBF2000291	1,6396
230543_at	LOC728177	hypothetical protein LOC728177	1,6374
1569320_at	GPBP1L1	GC-rich promoter binding protein 1-like 1	1,6366
228121_at	TGFB2	transforming growth factor, beta 2	1,6356
201101_s_at	BCLAF1	BCL2-associated transcription factor 1	1,6342
222456_s_at	LIMA1	LIM domain and actin binding 1	1,6341
200796_s_at	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	1,6313
235686_at	C2orf60	chromosome 2 open reading frame 60	1,6283
211828_s_at	TNIK	TRAF2 and NCK interacting kinase	1,6279
205383_s_at	ZBTB20	zinc finger and BTB domain containing 20	1,6241
210538_s_at	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	1,6238
239629_at	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	1,6206
212794_s_at	KIAA1033	KIAA1033	1,6197
243790_at	ZNF585A	zinc finger protein 585A	1,6174

219239_s_at	ZNF654	zinc finger protein 654	1,6152
1555731_a_at	AP1S3	adaptor-related protein complex 1, sigma 3 subunit interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1,6145
204864_s_at	IL6ST		1,6137
221986_s_at	KLHL24	kelch-like 24 (Drosophila)	1,6128
213816_s_at	MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	1,6108
210511_s_at	INHBA	inhibin, beta A	1,6053
212938_at	COL6A1	collagen, type VI, alpha 1	1,6050
210995_s_at	TRIM23	tripartite motif-containing 23	1,6049
219608_s_at	FBXO38	F-box protein 38	1,6024
209258_s_at	SMC3	structural maintenance of chromosomes 3	1,6006
222846_at	RAB8B	RAB8B, member RAS oncogene family	1,5980
1557169_x_at	HCG11	HLA complex group 11	1,5955
230296_at	C16orf52	Chromosome 16 open reading frame 52	1,5949
1555326_a_at	ADAM9	ADAM metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)	1,5921
243752_s_at	PSCD3	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 3	1,5919
235996_at	RASSF8	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 8	1,5913
204472_at	GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	1,5879
213850_s_at	SFRS2IP	splicing factor, arginine/serine-rich 2, interacting protein	1,5870
208960_s_at	KLF6	Kruppel-like factor 6	1,5866
242006_at	LCA5	Leber congenital amaurosis 5	1,5858
205018_s_at	MBNL2	muscleblind-like 2 (Drosophila)	1,5851
202412_s_at	USP1	ubiquitin specific peptidase 1	1,5850
217097_s_at	PHTF2	putative homeodomain transcription factor 2	1,5848
206917_at	GNA13	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13	1,5836
210655_s_at	FOXO3	forkhead box O3	1,5835
1559096_x_at	FBXO9	F-box protein 9	1,5770
1567032_s_at	ZNF160	zinc finger protein 160	1,5766
213658_at	NA	MRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 826033	1,5759
235421_at	MAP3K8	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	1,5749
205787_x_at	ZC3H11A	zinc finger CCCH-type containing 11A	1,5677
204131_s_at	FOXO3	forkhead box O3	1,5670
1555609_a_at	ZMAT3	zinc finger, matrin type 3	1,5664
224933_s_at	JMJD1C	jumonji domain containing 1C	1,5644
201942_s_at	CPD	carboxypeptidase D	1,5641
214552_s_at	RABEP1	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1	1,5640
227613_at	ZNF331	zinc finger protein 331	1,5636
240528_s_at	EXOC4	exocyst complex component 4	1,5635
243287_s_at	OSTM1	osteopetrosis associated transmembrane protein 1	1,5609
1554726_at	ZNF655	zinc finger protein 655	1,5608
1554007_at	NA	CDNA clone IMAGE:5303689	1,5573
201024_x_at	EIF5B	eukaryotic translation initiation factor 5B	1,5562
206025_s_at	TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	1,5554
222853_at	FLRT3	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	1,5546
212030_at	RBM25	RNA binding motif protein 25	1,5540
224218_s_at	TRPS1	trichorhinophalangeal syndrome I	1,5540
1555559_s_at	USP25	ubiquitin specific peptidase 25	1,5534
206396_at	SLC1A1	solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	1,5514
225045_at	CCDC88A	coiled-coil domain containing 88A	1,5487

1554685_a_at	KIAA1199	KIAA1199	1,5481
226630_at	C14orf106	chromosome 14 open reading frame 106	1,5452
235381_at	NA	Homo sapiens, clone IMAGE:3457110, mRNA	1,5450
215711_s_at	WEE1	WEE1 homolog (S. pombe)	1,5436
203716_s_at	DPP4	dipeptidyl-peptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	1,5435
202035_s_at	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1	1,5429
201211_s_at	DDX3X	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	1,5425
33148_at	ZFR	zinc finger RNA binding protein	1,5423
1553694_a_at	PIK3C2A	phosphoinositide-3-kinase, class 2, alpha polypeptide	1,5422
217403_s_at	ZNF227	zinc finger protein 227	1,5398
201615_x_at	CALD1	caldesmon 1	1,5388
221806_s_at	SETD5	SET domain containing 5	1,5384
209456_s_at	FBXW11	F-box and WD repeat domain containing 11	1,5382
212220_at	PSME4	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4	1,5363
242900_at	ALG10B	asparagine-linked glycosylation 10 homolog B (yeast, alpha-1,2-glucosyltransferase)	1,5356
1553725_s_at	ZNF644	zinc finger protein 644	1,5352
201992_s_at	KIF5B	kinesin family member 5B	1,5351
1552613_s_at	CDC42SE2	CDC42 small effector 2	1,5346
235189_at	NARG2	NMDA receptor regulated 2	1,5343
211027_s_at	IKBKB	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	1,5340
232112_at	RALGPS2	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2	1,5332
232636_at	SLITRK4	SLIT and NTRK-like family, member 4	1,5328
201502_s_at	NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	1,5325
213640_s_at	LOX	lysyl oxidase	1,5324
212332_at	RBL2	retinoblastoma-like 2 (p130)	1,5323
210089_s_at	LAMA4	laminin, alpha 4	1,5316
209376_x_at	SFRS2IP	splicing factor, arginine/serine-rich 2, interacting protein	1,5305
211602_s_at	TRPC1	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 1	1,5301
219558_at	ATP13A3	ATPase type 13A3	1,5300
243904_at	NA	CDNA clone IMAGE:5287121	1,5297
215990_s_at	BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	1,5296
228527_s_at	SLC25A37	Solute carrier family 25, member 37	1,5289
221771_s_at	HSMPP8	M-phase phosphoprotein, mpp8	1,5274
200598_s_at	HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	1,5261
218748_s_at	EXOC5	exocyst complex component 5	1,5247
208562_s_at	ABCC9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	1,5198
233827_s_at	SUPT16H	suppressor of Ty 16 homolog (S. cerevisiae)	1,5175
214723_x_at	KIAA1641	KIAA1641	1,5163
212107_s_at	DHX9	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	1,5157
236557_at	ZBTB38	zinc finger and BTB domain containing 38	1,5155
233655_s_at	FAM29A	family with sequence similarity 29, member A	1,5148
223079_s_at	GLS	glutaminase	1,5138
230291_s_at	NFIB	Nuclear factor I/B	1,5114
204969_s_at	RDX	radixin	1,5110
212362_at	ATP2A2	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	1,5097
204863_s_at	IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1,5078

210281_s_at	ZMYM2	zinc finger, MYM-type 2	1,5036
212007_at	UBXD2	UBX domain containing 2	1,5031
201914_s_at	SEC63	SEC63 homolog (S. cerevisiae)	1,5006
215570_s_at	ZNF780A ZNF780B	zinc finger protein 780A zinc finger protein 780B	1,4995
224863_at	GNAQ	Guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide	1,4986
216449_x_at	HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	1,4979
1553055_a_at	SLFN5	schlafen family member 5	1,4971
214305_s_at	SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	1,4970
210818_s_at	BACH1	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1	1,4944
1564796_at	EMP1	epithelial membrane protein 1	1,4933
241946_at	ZDHHC21	zinc finger, DHHC-type containing 21	1,4915
228498_at	NA	Transcribed locus, strongly similar to XP_531236.1 hypothetical protein XP_531236 [Pan troglodytes]	1,4914
203542_s_at	KLF9	Kruppel-like factor 9	1,4897
236978_at	NA	Transcribed locus	1,4883
1569106_s_at	SETD5	SET domain containing 5	1,4879
204384_at	GOLGA2	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2	1,4872
1553122_s_at	RBAK	RB-associated KRAB zinc finger	1,4870
220342_x_at	EDEM3	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3	1,4869
206241_at	KPNA5	karyopherin alpha 5 (importin alpha 6)	1,4867
203990_s_at	UTX	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome	1,4862
225706_at	GLCC1	glucocorticoid induced transcript 1	1,4847
239823_at	NA	Transcribed locus	1,4830
201294_s_at	WSB1	WD repeat and SOCS box-containing 1	1,4828
201169_s_at	BHLHB2	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	1,4806
214336_s_at	COPA	coatamer protein complex, subunit alpha	1,4793
204132_s_at	FOXO3	forkhead box O3	1,4783
206059_at	ZNF91	zinc finger protein 91	1,4773
1557100_s_at	HECTD1	HECT domain containing 1	1,4765
211124_s_at	KITLG	KIT ligand	1,4760
224311_s_at	CAB39	calcium binding protein 39	1,4758
1561886_a_at	NA	CDNA FLJ39506 fis, clone PROST2017612	1,4756
216004_s_at	PKNOX1	PBX/knotted 1 homeobox 1	1,4750
214390_s_at	BCAT1	branched chain aminotransferase 1, cytosolic	1,4746
1554249_a_at	ZNF638	zinc finger protein 638	1,4745
225173_at	ARHGAP18	Rho GTPase activating protein 18	1,4730
223254_s_at	KIAA1333	KIAA1333	1,4720
239077_at	GALNACT-2	chondroitin sulfate GalNAcT-2	1,4710
238532_at	DPF3	D4, zinc and double PHD fingers, family 3	1,4702
1557507_at	NA	CDNA clone IMAGE:3910094	1,4696
212392_s_at	LOC652526 LOC727927 PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin) similar to phosphodiesterase 4D interacting protein isoform 2	1,4693
1562234_a_at	LOC652725 NAV3	neuron navigator 3 similar to neuron navigator 3	1,4687
231921_at	C2orf37	chromosome 2 open reading frame 37	1,4662
201085_s_at	SON	SON DNA binding protein	1,4636
201646_at	SCARB2	scavenger receptor class B, member 2	1,4633
206668_s_at	SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1	1,4621

212650_at	EHBP1	EH domain binding protein 1	1,4608
202434_s_at	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	1,4606
219679_s_at	WAC	WW domain containing adaptor with coiled-coil	1,4602
222122_s_at	THOC2	THO complex 2	1,4599
1557455_s_at	MOSPD1	motile sperm domain containing 1	1,4585
229712_at	SNAPC3	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 3, 50kDa	1,4584
1559993_at	SFXN3	Sideroflexin 3	1,4576
1555229_a_at	C1S	complement component 1, s subcomponent	1,4575
222406_s_at	PNRC2	proline-rich nuclear receptor coactivator 2	1,4565
212008_at	UBXD2	UBX domain containing 2	1,4564
206036_s_at	REL	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)	1,4564
203597_s_at	WBP4	WW domain binding protein 4 (formin binding protein 21)	1,4535
225915_at	CAB39L	calcium binding protein 39-like	1,4526
201070_x_at	SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	1,4498
1569025_s_at	FAM13A1	family with sequence similarity 13, member A1	1,4487
209289_at	NFIB	nuclear factor I/B	1,4485
214693_x_at	KIAA1245	KIAA1245	1,4449
210286_s_at	SLC4A7	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7	1,4448
215739_s_at	TUBGCP3	tubulin, gamma complex associated protein 3	1,4447
229676_at	PAPD1	PAP associated domain containing 1	1,4443
210990_s_at	LAMA4	laminin, alpha 4	1,4437
1569472_s_at	TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3	1,4431
238478_at	BNC2	basonuclin 2	1,4424
222611_s_at	PSPC1	paraspeckle component 1	1,4413
226658_at	PDPN	podoplanin	1,4408
1553603_s_at	ARL6IP2	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 2	1,4397
223584_s_at	KBTBD2	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 2	1,4394
1552611_a_at	JAK1	Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)	1,4392
1554159_a_at	ZMYND11	zinc finger, MYND domain containing 11	1,4392
204596_s_at	STC1	stanniocalcin 1	1,4390
229881_at	KLF12	Kruppel-like factor 12	1,4390
208701_at	APLP2	Amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	1,4389
223169_s_at	RHOU	ras homolog gene family, member U	1,4384
206748_s_at	SPAG9	sperm associated antigen 9	1,4381
213336_at	BAZ1B	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	1,4378
227883_at	FLJ36031	hypothetical protein FLJ36031	1,4376
236290_at	DOK6	docking protein 6	1,4366
220285_at	FAM108B1	family with sequence similarity 108, member B1	1,4363
206474_at	PCTK2	PCTAIRE protein kinase 2	1,4359
223879_s_at	OXR1	oxidation resistance 1	1,4338
216926_s_at	KIAA0892	KIAA0892	1,4338
213032_at	NFIB	nuclear factor I/B	1,4313
215286_s_at	PHTF2	putative homeodomain transcription factor 2	1,4296
202206_at	ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	1,4275
242429_at	ZNF567	zinc finger protein 567	1,4241
243735_at	NA	CDNA FLJ38461 fis, clone FEBRA2020977	1,4226
228638_at	FAM76A	Family with sequence similarity 76, member A	1,4218
211000_s_at	IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1,4214
1565525_a_at	TCP11L2	t-complex 11 (mouse)-like 2	1,4214

205070_at	ING3	inhibitor of growth family, member 3	1,4203
217176_s_at	ZFX	zinc finger protein, X-linked	1,4198
1554637_a_at	CBFA2T2	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 2	1,4197
210077_s_at	SFRS5	splicing factor, arginine/serine-rich 5	1,4192
216521_s_at	BRCC3	BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3	1,4185
1555830_s_at	FAM62B	family with sequence similarity 62 (C2 domain containing) member B	1,4176
224365_s_at	TIGD7	tigger transposable element derived 7	1,4176
243134_at	CHD2	Chromodomain helicase DNA binding protein 2	1,4152
208994_s_at	PPIG	peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)	1,4152
206113_s_at	RAB5A	RAB5A, member RAS oncogene family	1,4149
228711_at	ZNF37A	zinc finger protein 37A	1,4144
232816_s_at	DDX11 DDX12 LOC642846	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11 (CHL1-like helicase homolog, <i>S. cerevisiae</i>) DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11-like DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 12 (CHL1-like helicase homolog, <i>S. cerevisiae</i>)	1,4142
202827_s_at	MMP14	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	1,4142
238699_s_at	CASK	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)	1,4140
232533_at	NA	CDNA FLJ13334 fis, clone OVARC1001846 CDNA FLJ31054 fis, clone HSYRA2000706	1,4136
1554229_at	LOC153222	adult retina protein	1,4135
212979_s_at	FAM115A	family with sequence similarity 115, member A	1,4127
241666_at	C3orf23	chromosome 3 open reading frame 23	1,4120
208561_at	ABCC9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	1,4115
235567_at	LOC283666	Hypothetical protein LOC283666	1,4106
244752_at	ZNF438	zinc finger protein 438	1,4080
227179_at	STAU2	staufer, RNA binding protein, homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	1,4062
204456_s_at	GAS1	growth arrest-specific 1	1,4058
213406_at	WSB1	WD repeat and SOCS box-containing 1	1,4056
218782_s_at	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2	1,4051
214452_at	BCAT1	branched chain aminotransferase 1, cytosolic	1,4047
238443_at	TFAM	transcription factor A, mitochondrial	1,4037
211574_s_at	CD46	CD46 molecule, complement regulatory protein	1,4037
229606_at	NA	Transcribed locus, strongly similar to XP_517366.1 similar to Serine/threonine protein phosphatase 2B catalytic subunit, alpha isoform (Calmodulin-dependent calcineurin A subunit, alpha isoform) (CAM-PRP catalytic subunit) [Pan troglodytes]	1,4034
244461_at	SPECC1	sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1	1,4025
1558722_at	ZNF252	zinc finger protein 252	1,4023
203346_s_at	MTF2	metal response element binding transcription factor 2	1,4009
1555202_a_at	P15RS	hypothetical protein FLJ10656	1,4008
238519_at	DDI2	DDI1, DNA-damage inducible 1, homolog 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	1,4005
225326_at	RBM27	RNA binding motif protein 27	1,3999
201107_s_at	THBS1	thrombospondin 1	1,3971
223260_s_at	POLK	polymerase (DNA directed) kappa	1,3969
214318_s_at	FRY	furry homolog (<i>Drosophila</i>)	1,3961
217881_s_at	CDC27	cell division cycle 27 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	1,3952
210654_at	TNFRSF10D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain	1,3951

211139_s_at	NAB1	NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)	1,3951
208893_s_at	DUSP6	dual specificity phosphatase 6	1,3938
204731_at	TGFBR3	transforming growth factor, beta receptor III	1,3929
1557918_s_at	SLC16A1	solute carrier family 16, member 1 (monocarboxylic acid transporter 1)	1,3909
219234_x_at	SCRN3	secernin 3	1,3890
1554878_a_at	ABCD3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	1,3883
210561_s_at	WSB1	WD repeat and SOCS box-containing 1	1,3883
218340_s_at	UBE1L2	ubiquitin-activating enzyme E1-like 2	1,3869
1570552_at	C18orf50	chromosome 18 open reading frame 50	1,3852
224359_s_at	HOOK3	hook homolog 3 (Drosophila)	1,3847
221430_s_at	RNF146	ring finger protein 146	1,3838
202516_s_at	DLG1	discs, large homolog 1 (Drosophila)	1,3825
225077_at	CHD2	chromodomain helicase DNA binding protein 2	1,3818
223189_x_at	MLL5	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5 (trithorax homolog, Drosophila)	1,3814
1556551_s_at	SLC39A6	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6	1,3803
218751_s_at	FBXW7	F-box and WD repeat domain containing 7	1,3791
1555337_a_at	ZNF317	zinc finger protein 317	1,3789
239441_at	ZNF780A	zinc finger protein 780A	1,3772
1554919_s_at	FLJ21062	hypothetical protein FLJ21062	1,3746
207053_at	SLC8A1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	1,3733
213872_at	C6orf62	Chromosome 6 open reading frame 62	1,3668
225241_at	CCDC80	coiled-coil domain containing 80	1,3618
204105_s_at	NRCAM	neuronal cell adhesion molecule	1,3608
225279_s_at	C3orf17	chromosome 3 open reading frame 17	1,3553
1553962_s_at	RHOB	ras homolog gene family, member B	1,3549
219501_at	ENOX1	ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 1	1,3529
211214_s_at	DAPK1	death-associated protein kinase 1	1,3484
215434_x_at	NBPF1 NBPF10	neuroblastoma breakpoint family, member 1 neuroblastoma breakpoint family, member 10	1,3479
234951_s_at	COL12A1	collagen, type XII, alpha 1	1,3477
203357_s_at	CAPN7	calpain 7	1,3388
205520_at	STRN	striatin, calmodulin binding protein	1,3387
235234_at	FLJ36874	FLJ36874 protein	1,3369
1559161_at	NA	CDNA FLJ38294 fis, clone FCBBF3010211	1,3367
235868_at	MGEA5	Meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	1,3366
210557_x_at	CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)	1,3326
211676_s_at	IFNGR1	interferon gamma receptor 1	1,3270
235082_at	PCNX	pecanex homolog (Drosophila)	1,3221
241969_at	ARID5B	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	1,3203
225240_s_at	MSI2	musashi homolog 2 (Drosophila)	1,3193
227680_at	ZNF326	zinc finger protein 326	1,3178
208180_s_at	HIST1H4H	histone cluster 1, H4h	1,3108
225511_at	GPRC5B	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	1,3034
1554661_s_at	C1orf71	chromosome 1 open reading frame 71	1,2967
224219_s_at	TRPC4	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4	1,2881
217430_x_at	COL1A1	collagen, type I, alpha 1	1,2793
201693_s_at	EGR1	early growth response 1	1,2676
208661_s_at	TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3	1,2125

208662_s_at	TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3	1,2044
201991_s_at	KIF5B	kinesin family member 5B	1,1373

Anexo B. Tabela de genes regulados após tratamento com 100 nM de VD₃.

<i>Probe Set ID</i>	<i>Gene Title</i>	<i>Gene Symbol</i>	<i>Fold</i>
206504_at	CYP24A1	cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	515.6076
215078_at	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	9.5172
213524_s_at	G0S2	G0/G1switch 2	7.3076
211470_s_at	SULT1C2	sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	6.0434
221042_s_at	CLMN	calmin (calponin-like, transmembrane)	5.9273
237252_at	THBD	thrombomodulin	5.6131
201743_at	CD14	CD14 molecule	5.5359
203888_at	THBD	thrombomodulin	5.5136
206227_at	CILP	cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphohydrolase	5.5102
203887_s_at	THBD	thrombomodulin	5.3859
209908_s_at	TGFB2	transforming growth factor, beta 2	4.7364
210058_at	MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13	4.5346
210059_s_at	MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13	4.5235
209909_s_at	TGFB2	transforming growth factor, beta 2	4.3948
219825_at	CYP26B1	cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	4.2105
219434_at	TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	4.1112
205466_s_at	HS3ST1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	4.0395
213568_at	OSR2	odd-skipped related 2 (Drosophila)	3.9100
205539_at	AVIL	advillin	3.8182
212268_at	SERPINB1	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	3.6833
223484_at	C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48	3.6224
213164_at	SLC5A3	solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3	3.5480
207526_s_at	IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	3.4796
220407_s_at	TGFB2	transforming growth factor, beta 2	3.4655
213839_at	KIAA0500	KIAA0500 protein	3.4592
228121_at	TGFB2	transforming growth factor, beta 2	3.3426
205342_s_at	SULT1C2	sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	3.3302
204114_at	NID2	nidogen 2 (osteonidogen)	3.2907
202679_at	NPC1	Niemann-Pick disease, type C1	3.2653
243296_at	PBEF1	Pre-B-cell colony enhancing factor 1	3.1490
218973_at	EFTUD1	elongation factor Tu GTP binding domain containing 1	3.1203
228726_at	SERPINB1	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	3.1031
209541_at	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	3.0955
235911_at	LOC440995	Hypothetical gene supported by BC034933; BC068085	3.0413
205935_at	FOXF1	forkhead box F1	3.0217
223169_s_at	RHOU	ras homolog gene family, member U	3.0175
212944_at	SLC5A3	solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3	3.0149
238999_at	NA	Transcribed locus	2.9539
213658_at	NA	MRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 826033	2.9526
229004_at	NA	CDNA FLJ26557 fis, clone LNF01992	2.9303
215501_s_at	DUSP10	dual specificity phosphatase 10	2.9062
213572_s_at	SERPINB1	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	2.7981
224762_at	SERINC2	serine incorporator 2	2.7960
218380_at	NLRP1	NLR family, pyrin domain containing 1	2.7954

223168_at	RHOU	ras homolog gene family, member U	2.7862
239178_at	FGF9	fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	2.7678
238532_at	DPF3	D4, zinc and double PHD fingers, family 3	2.7530
221898_at	PDPN	podoplanin	2.7247
203236_s_at	LGALS9	lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)	2.7184
226658_at	PDPN	podoplanin	2.7049
228399_at	OSR1	odd-skipped related 1 (Drosophila)	2.6479
1570155_at	NA	Homo sapiens, clone IMAGE:4427279, mRNA	2.6167
201531_at	ZFP36	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	2.5975
210046_s_at	IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	2.5971
223322_at	RASSF5	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 5	2.5922
209747_at	TGFB3	transforming growth factor, beta 3	2.5441
206396_at	SLC1A1	solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	2.5147
209540_at	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	2.4599
210045_at	IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	2.4579
227300_at	TMEM119	transmembrane protein 119	2.4336
202286_s_at	TACSTD2	tumor-associated calcium signal transducer 2	2.3652
223723_at	MFI2	antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5	2.2911
213664_at	SLC1A1	solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	2.2660
209875_s_at	SPP1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	2.2558
232994_s_at	RGNEF	Rho-guanine nucleotide exchange factor	2.2532
225759_x_at	CLMN	calmin (calponin-like, transmembrane)	2.2442
236442_at	DPF3	D4, zinc and double PHD fingers, family 3	2.2410
230224_at	LOC644353	hypothetical LOC644353	2.2355
209373_at	MALL	mal, T-cell differentiation protein-like	2.2344
215034_s_at	TM4SF1	transmembrane 4 L six family member 1	2.1698
1552508_at	KCNE4	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	2.1635
209387_s_at	TM4SF1	transmembrane 4 L six family member 1	2.1623
221563_at	DUSP10	dual specificity phosphatase 10	2.1469
227179_at	STAU2	staufen, RNA binding protein, homolog 2 (Drosophila)	2.1436
1552507_at	KCNE4	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	2.1285
236787_at	NA	CDNA FLJ35091 fis, clone PLACE6005786	2.1026
218918_at	MAN1C1	mannosidase, alpha, class 1C, member 1	2.0831
233555_s_at	SULF2	sulfatase 2	2.0782
224724_at	SULF2	sulfatase 2	2.0558
203045_at	NINJ1	ninjurin 1	2.0544
204879_at	PDPN	podoplanin	2.0449
228523_at	NANOS1	nanos homolog 1 (Drosophila)	2.0220
228347_at	SIX1	SIX homeobox 1	2.0165
219610_at	RGNEF	Rho-guanine nucleotide exchange factor	2.0102
222918_at	RAB9B	RAB9B, member RAS oncogene family	2.0073
224505_s_at	PLCD4	phospholipase C, delta 4	2.0020
226722_at	FAM20C	family with sequence similarity 20, member C	1.9974
211653_x_at	AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)	1.9769
1553313_s_at	SLC5A3	solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3	1.9768

204271_s_at	EDNRB	endothelin receptor type B	1.9685
201983_s_at	EGFR	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	1.9631
230925_at	APBB1IP	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein	1.9539
204396_s_at	GRK5	G protein-coupled receptor kinase 5	1.9508
235489_at	RHOJ	ras homolog gene family, member J	1.9476
214180_at	MAN1C1	mannosidase, alpha, class 1C, member 1	1.9402
204395_s_at	GRK5	G protein-coupled receptor kinase 5	1.9362
202910_s_at	CD97	CD97 molecule	1.9267
204345_at	COL16A1	collagen, type XVI, alpha 1	1.9201
204472_at	GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	1.9184
204610_s_at	CCDC85B	coiled-coil domain containing 85B	1.9126
203685_at	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	1.9050
1556385_at	NA	CDNA FLJ39926 fis, clone SPLEN2021157	1.8938
32502_at	GDPD5	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5	1.8750
213167_s_at	SLC5A3	solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3	1.8746
203185_at	RASSF2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2	1.8602
205251_at	PER2	period homolog 2 (Drosophila)	1.8594
213640_s_at	LOX	lysyl oxidase	1.8475
209716_at	CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)	1.8449
216594_x_at	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	1.8372
201044_x_at	DUSP1	dual specificity phosphatase 1	1.8366
201502_s_at	NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	1.8153
1554004_a_at	RGNEF	Rho-guanine nucleotide exchange factor	1.8052
213261_at	LBA1	lupus brain antigen 1	1.7984
235944_at	HMCN1	hemicentin 1	1.7749
202887_s_at	DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4	1.7725
203716_s_at	DPP4	dipeptidyl-peptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	1.7723
201118_at	PGD	phosphogluconate dehydrogenase	1.7718
229404_at	TWIST2	twist homolog 2 (Drosophila)	1.7546
224919_at	MRPS6	mitochondrial ribosomal protein S6	1.7394
209699_x_at	AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)	1.7282
1554163_at	TWIST2	twist homolog 2 (Drosophila)	1.7214
217995_at	SQRDL	sulfide quinone reductase-like (yeast)	1.7213
204151_x_at	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	1.7090
203445_s_at	CTDSP2	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 2	1.6992
221959_at	FAM110B	family with sequence similarity 110, member B	1.6782
203632_s_at	GPRC5B	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	1.6576
203037_s_at	MTSS1	metastasis suppressor 1	1.6532
201294_s_at	WSB1	WD repeat and SOCS box-containing 1	1.6399
209815_at	PTCH1	patched homolog 1 (Drosophila)	1.6075
215723_s_at	PLD1	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific	1.6059
225626_at	PAG1	phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1	1.5548

1555854_at	AKR1C1 AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase) aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)	1.4021
209160_at	AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	1.3921
237411_at	ADAMTS6	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 6	0.6833
222572_at	PPM2C	protein phosphatase 2C, magnesium-dependent, catalytic subunit	0.5569
221211_s_at	C21orf7	chromosome 21 open reading frame 7	0.5482
213425_at	WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	0.5464
221685_s_at	CCDC99	coiled-coil domain containing 99	0.5401
222108_at	AMIGO2	adhesion molecule with Ig-like domain 2	0.5311
218718_at	PDGFC	platelet derived growth factor C	0.5231
206432_at	HAS2	hyaluronan synthase 2	0.5227
235236_at	NA	CDNA FLJ31436 fis, clone NT2NE2000636	0.4988
225820_at	PHF17	PHD finger protein 17	0.4886
204614_at	SERPINF2	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	0.4845
236044_at	PPAPDC1A	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A	0.4805
227828_s_at	TMEM166	transmembrane protein 166	0.4716
213238_at	ATP10D	ATPase, Class V, type 10D	0.4692
231001_at	FIBIN	fin bud initiation factor	0.4670
204284_at	PPP1R3C	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	0.4568
205990_s_at	WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	0.4501
220976_s_at	KRTAP1-1 LOC728946	keratin associated protein 1-1 similar to keratin associated protein 1-1	0.4488
202936_s_at	SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)	0.4482
213906_at	MYBL1	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	0.4473
205846_at	PTPRB	protein tyrosine phosphatase, receptor type, B	0.4385
222773_s_at	GALNT12	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 12 (GalNAc-T12)	0.4376
231292_at	EID3	EP300 interacting inhibitor of differentiation 3	0.4302
228033_at	E2F7	E2F transcription factor 7	0.4292
230147_at	F2RL2	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	0.4274
204120_s_at	ADK	adenosine kinase	0.4256
206825_at	OXTR	oxytocin receptor	0.4240
204337_at	RGS4	regulator of G-protein signaling 4	0.4195
201631_s_at	IER3	immediate early response 3	0.4138
231986_at	RIMS1	regulating synaptic membrane exocytosis 1	0.4089
230250_at	PTPRB	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, B	0.3860
203989_x_at	F2R	coagulation factor II (thrombin) receptor	0.3566
218885_s_at	GALNT12	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 12 (GalNAc-T12)	0.3557
1555673_at	LOC728285 LOC728934	similar to keratin associated protein 2-4	0.3426
206343_s_at	NRG1	neuregulin 1	0.3093
205159_at	CSF2RB	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	0.2556

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa/2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2010.
2. Smart CR, Byrne C, Smith RA, et al. Twenty-year follow-up of the breast cancers diagnosed during the Breast Cancer Detection Demonstration Project. *CA Cancer J Clin* 1997; 47:134-49.
3. Doussal VL, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtos F, Brunet M. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). *Cancer* 1989; 64:1914-21.
4. Howel L, Gandour-Edwards R, O'Sullivan D. Application of the Scarff-Bloom-Richardson tumor grading system to fine needle aspirates of the breast. *Am J Clin Pathol* 1994; 101:262-5.
5. Amir E, Freedman OC, Seruga B, Evans DG. Assessing women at high risk of breast cancer: a review of risk assessment models. *J Natl Cancer Inst*. 2010 May 19;102(10):680-91. Review.
6. Stroud ML, Stilgoe S, Stott VE, Alhabian O, Salman K. Vitamin D - a review. *Aust Fam Physician*. 2008 Dec;37(12):1002-5. Review.
7. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2004 Dec;80(6 Suppl):1678S-88S. Review.
8. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2007 Sep;7(9):684-700. Review.
9. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr*. 2008 Aug;88(2):491S-499S. Review.
10. Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. *Molecular Cell Biology*. 4ªed. Nova York: W. H. Freeman & Co.; c2000.
11. Pendas-Franco N, Gonzalez-Sancho JM, Suarez Y, Aguilera O, Steinmeyer A, Gamallo C, Berciano MT, Lafarga M, Munoz A. Vitamin D regulates the phenotype of human breast cancer cells. *Differentiation*. 2007 Mar;75(3):193-207.
12. Dunlop TW, Vaisanen S, Frank C, Carlberg C. The genes of the coactivator TIF2 and the corepressor SMRT are primary 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ targets. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May;89-90(1-5):257-60.
13. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol*. 1999 Aug;277(2 Pt 2):F157-75.
14. Gorham E, Garland C, Garland F. Acid haze air pollution and breast and colon cancer in 20 Canadian cities. *Can J Public Health*. 1989;80:96-100.
15. Garland F, Garland C, Gorham E, Young J Jr. Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev Med*. 1990;19: 614-622.
16. Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health*. 2006 Feb;96(2):252-61. Review.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

17. John E, Schwartz G, Dreon D, Koo J. Vitamin D and breast cancer risk: the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971–1975 to 1992. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8:399–406.
 18. Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Garland FC. Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol.* 2009 Jul;19(7):468-83. Review.
 19. Chen P, Hu P, Xie D, Qin Y, Wang F, Wang H. Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jun;121(2):469-77.
 20. Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE. 1 alpha,25- dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res.* 2000;87(3):214–220.
 21. Lipkin M, Newmark HL. Vitamin D, calcium and prevention of breast cancer: a review. *J Am Coll Nutr.* 1999;18 (5 suppl):392S–397S.
 22. Guyton KZ, Kensler TW, Posner GH. Cancer chemoprevention using natural vitamin D and synthetic analogs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:421–442.
 23. Stumpf WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y, DeLuca HF. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science.* 1979 Dec 7;206(4423):1188-90
 24. Suda T, Abe E. Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. In: Norman A, Schaefer K, Herrath DV, Grigdeit HG, eds. *Vitamin D: chemical, biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism.* New York: Walter de Gruyter, 1982: 59-64.
 25. Tanaka H, Abe E, Miyaura C, Kuribayashi T, Konno K, Nishii Y, Suda T. 1 alpha,25-Dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukaemia cell line (HL-60). *Biochem J* 1982; 204: 713-719
 26. Hager G, Formanek M, Gedlicka C, Thurnher D, Knerer B, Kornfehl J. 1,25(OH)₂ vitamin D3 induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes P21 and P27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Acta Otolaryngol.* 2001 ;121(1):103-9.
 27. Moffatt KA, Johannes WU, Hedlund TE, Miller GJ. Growth inhibitory effects of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3) are mediated by increased levels of p21 in the prostatic carcinoma cell line ALVA-31. *Cancer Res.* 2001 Oct 1;61(19):7122-9.
 28. Kawata H, Kamiakito T, Takayashiki N, Tanaka A. Vitamin D3 suppresses the androgen-stimulated growth of mouse mammary carcinoma SC-3 cells by transcriptional repression of fibroblast growth factor 8. *J Cell Physiol.* 2006 Jun;207(3):793-
 29. Costa JL, Eijk PP, van de Wiel MA, ten Berge D, Schmitt F, Narvaez CJ, Welsh J, Ylstra B. Anti-proliferative action of vitamin D in MCF7 is still active after siRNA-VDR knock-down. *BMC Genomics.* 2009 Oct 28;10:499.
 30. Krishnan AV, Trump DL, Johnson CS, Feldman D. The role of vitamin D in cancer prevention and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010 Jun;39(2):401-18
 31. Masuda S, Jones G. Promise of vitamin D analogues in the treatment of hyperproliferative conditions. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:797–808.
 32. White JH. Profiling 1,25-dihydroxyvitamin D receptor expression by microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;89–90:239–244.
-

-
33. Gocek E, Studzinski GP. Vitamin D and differentiation in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009;46(4):190–209.
 34. Samuel S, Sitrin MD. Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. *Nutr Rev.* 2008 Oct;66(10 Suppl 2):S116-24.
 35. Ylikomi T, Laaksi I, Lou YR, et al. Antiproliferative action of vitamin D. *Vitam Horm* 2002;64:357–406.
 36. Park WH, Seol JG, Kim ES, et al. Induction of apoptosis by vitamin D3 analogue EB1089 in NCI-H929 myeloma cells via activation of caspase 3 and p38 MAP kinase. *Br J Haematol* 2000;109(3):576–83.
 37. Krishnan AV, Moreno J, Nonn L, Swami S, Peehl DM, Feldman D. Calcitriol as a chemopreventive and therapeutic agent in prostate cancer: role of anti-inflammatory activity. *J Bone Miner Res.* 2007 Dec;22 Suppl 2:V74-80.
 38. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
 39. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Nov;4(11):839-49.
 40. Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2009 Nov 5.
 41. Polyak K, Kalluri R. The Role of the Microenvironment in Mammary Gland Development and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Jun 30.
 42. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):375-9.
 43. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell.* 2005 May 6;121(3):335-48.
 44. Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res.* 2001 Mar 10;264(1):169-84.
 45. Orimo A, Tomioka Y, Shimizu Y, Sato M, Oigawa S, Kamata K, Nogi Y, Inoue S, Takahashi M, Hata T, and Muramatsu M. Cancer-associated myofibroblasts possess various factors to promote endometrial tumor progression. *Clin. Cancer Res.* 7, 3097–3105. (2001).
 46. Tlsty TD, Hein PW. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev.* 2001 Feb;11(1):54-9.
 47. Mahadevan D, Von Hoff DD. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2007 Apr;6(4):1186-97. Epub 2007 Apr 3. Review.
 48. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol.* 2003 Jul;200(4):429-47. Review.
 49. Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer.* 2004 Aug;45 Suppl 2:S163-75. Review.
 50. Barcellos-Hoff M., Ravani S.A. Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potencial by inirradiated epithelial cells. *Cancer Research.* 2000; 60:1254-60.
-

51. Maeda T., Alexander C.M., Friedl A. Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Research*. 2004;64(2):612-21.
 52. Jessani N., Humphrey M., McDonald W.H., Niessen S., Masuda K., Gangadharan B., Yates J.R., Mueller B.M., Cravatt B.F. Carcinoma and stromal enzyme activity profiles associated with breast tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(38):13756-61.
 53. Werb, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*, 91: 439-442, 1997.
 54. Kuperwasser, C. et al. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 4966–4971 (2004).
 55. Virchow, R. *Die Cellularpathologie in Ihrer Begründung auf Physiologische und Pathologische Gewebelehre* (Hirschwald, A., Berlin, Germany, 1858).
 56. Duvall, M. *Atlas d'Embryologie* (Masson, Paris, 1879).
 57. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 May;6(5):392-401.
 58. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349–363 (2002).
 59. Parsonage, G. et al. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol.* 26, 150–156 (2005).
 60. Chang, H. Y. et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 12877–12882 (2002).
 61. Simian, M. et al. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* 128, 3117–3131 (2001).
 62. Wiseman, B. S. & Werb, Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* 296, 1046–1049 (2002).
 63. Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:119-50. Review.
 64. Rollins, B. J., Stier, P., Ernst, T. & Wong, G. G. The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4687–4695 (1989).
 65. Clayton, A. et al. Cellular activation through the ligation of intercellular adhesion molecule-1. *J. Cell Sci.* 111, 443–453 (1998).
 66. Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*. 2006 Aug;5(15):1597-601. Epub 2006 Aug 1.
 67. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999; 59:5002-11.
 68. Cornil, I. et al. Fibroblast cell interactions with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 6028–6032 (1991).
 69. Sporn, M. B. & Suh, N. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis* 21, 525–530 (2000).
 70. Kerbel, R. S. A cancer therapy resistant to resistance. *Nature* 390, 335–336 (1997).
-

-
71. Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* 2004; 45:S163-75.
72. Silzle T, Randolph GJ, Kreutz M, Kunz-Schughart LA. The fibroblast: Sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue. *Int J Cancer* 2004; 108:173-80.
73. Wang, X. M., Yu, D. M., McCaughan, G. W. & Gorrell, M. D. Fibroblast activation protein increases apoptosis, cell adhesion, and migration by the LX-2 human stellate cell line. *Hepatology* 42, 935–945 (2005).
74. Scott, A. M. et al. A Phase I dose-escalation study of sibtuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clin. Cancer Res.* 9, 1639–1647 (2003).
75. Ricchi, P., Zarrilli, R., Di Palma, A. & Acquaviva, A. M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. *Br. J. Cancer* 88, 803–807 (2003).
76. Rozenchan PB, Carraro DM, Brentani H, de Carvalho Mota LD, Bastos EP, e Ferreira EN, Torres CH, Katayama ML, Roela RA, Lyra EC, Soares FA, Folgueira MA, Góes JC, Brentani MM. Reciprocal changes in gene expression profiles of cocultured breast epithelial cells and primary fibroblasts. *Int J Cancer*. 2009 Dec 15;125(12):2767-77.
77. Roskelley CD, Bissell MJ. The dominance of the microenvironment in breast and ovarian cancer. *Semin Cancer Biol.* 2002 Apr;12(2):97-104. Review.
78. Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Smyczek S, Romu S, Tribble E, Welsh JC, Byrne B, Narvaez CJ. Impact of the Vitamin D3 receptor on growth-regulatory pathways in mammary gland and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002 Dec;83(1-5):85-92.
79. Barbosa EM, Nonogaki S, Katayama ML, Folgueira MA, Alves VF, Brentani MM. Vitamin D3 modulation of plasminogen activator inhibitor type-1 in human breast carcinomas under organ culture. *Virchows Arch.* 2004 Feb;444(2):175-82.
80. Katayama ML, Pasini FS, Folgueira MA, Snitcovsky IM, Brentani MM. Molecular targets of 1,25(OH)2D3 in HC11 normal mouse mammary cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Jan;84(1):57-69.
81. Bortman P, Folgueira MA, Katayama ML, Snitcovsky IM, Brentani MM. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on breast cells: a mini review. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Jan;35(1):1-9. Review.
82. GeneChip® Expression Analysis Technical Manual, Rev 3.
83. R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL
84. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003 Apr;4(2):249-64.
85. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics.* 2003 Jan 22;19(2):185-93.
86. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 24;98(9):5116-21. Epub 2001 Apr 17. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Aug 28;98(18):10515
-

-
87. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 1998 Jun;24(6):954-8, 960, 962.
 88. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.
 89. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality. *Biometrika* 1965;52(3):591-9.
 90. Franke, W. W., Schmid, E., Osborn, M. & Weber, K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 75, 5034–5038 (1978).
 91. Franke, W. W., Schmid, E., Osborn, M. & Weber, K. Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 81, 570–580 (1979).
 92. Mork, C., van Deurs, B. & Petersen, O. W. Regulation of vimentin expression in cultured human mammary epithelial cells. *Differentiation* 43, 146–156 (1990).
 93. Davies BR, Davies MP, Gibbs FE, Barraclough R, Rudland PS. Induction of the metastatic phenotype by transfection of a benign rat mammary epithelial cell line with the gene for p9Ka, a rat calcium-binding protein, but not with the oncogene EJ-ras-1. *Oncogene*. Apr;8(4):999-1008 (1993).
 94. Grigorian M, Ambartsumian N, Lykkesfeldt AE, Bastholm L, Elling F, Georgiev G, Lukanidin E. Effect of mts1 (S100A4) expression on the progression of human breast cancer cells. *Int J Cancer*. 1996 Sep 17;67(6):831-41.
 95. Rudland PS, Platt-Higgins A, Renshaw C, West CR, Winstanley JH, Robertson L, Barraclough R. Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res*. 2000 Mar 15;60(6):1595-603
 96. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther*. 2006 Dec;5(12):1640-6. Epub 2006 Dec 5.
 97. Alon Y, Horowitz AT, Biran S, Weiss DW, Doljanski F. Immunofluorescent characterization of fibronectin, laminin, and keratin in normal and neoplastic human mammary epithelial cells in culture and in breast tissue sections. *Int J Tissue React*. 1986;8(5):401-10.
 98. Altmannsberger M, Osborn M, Hölscher A, Schauer A, Weber K. The distribution of keratin type intermediate filaments in human breast cancer. An immunohistological study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1981;37(3):277-84.
 99. DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today*. 1994 Oct;15(10):490-5.
 100. Mehta RG, Mehta RR. Vitamin D and cancer. *J Nutr Biochem*. 2002 May;13(5):252-264.
 101. Gache C, Berthois Y, Cvitkovic E, Martin PM, Saez S. Differential regulation of normal and tumoral breast epithelial cell growth by fibroblasts and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Breast Cancer Res Treat*. 1999 May;55(1):29-39.
 102. Zabel M, Flig K, Gebarowska E, Surdyk-Zasada J. The effect of calcitriol and its analogues on proliferation and hormone expression in cultured cells of thyroid medullary carcinomas. *Folia Morphol (Warsz)*. 2003 Nov;62(4):463-5.
 103. Taparia S, Fleet JC, Peng JB, Wang XD, Wood RJ. 1,25-Dihydroxyvitamin D and 25-hydroxyvitamin D--mediated regulation of TRPV6 (a putative epithelial calcium channel) mRNA expression in Caco-2 cells. *Eur J Nutr*. 2006 Jun;45(4):196-204. Epub 2005 Dec 21.
-

-
104. Smith DC, Johnson CS, Freeman CC, Muindi J, Wilson JW, Trump DL. A Phase I trial of calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res*. 1999 Jun;5(6):1339-45.
105. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C. Evidence for persistent vitamin D 1-alpha-hydroxylation in hemodialysis patients: evolution of serum 1,25-dihydroxycholecalciferol after 6 months of 25-hydroxycholecalciferol treatment. *Nephron Clin Pract*. 2008;110(1):c58-65. Epub 2008 Aug 25.
106. Maeda S, Omata M. Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci* 2008;99(5):836-42. 65.
107. Moreno J, Krishnan AV, Swami S, et al. Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2005;65(17):7917-25.
108. Jensen SS, Madsen MW, Lukas J, Binderup L, Bartek J. Inhibitory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) on the G(1)-S phase-controlling machinery. *Mol Endocrinol*. 2001 Aug;15(8):1370-80.
109. Koli K, Keski-Oja J. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues down-regulate cell invasion-associated proteases in cultured malignant cells. *Cell Growth Differ*. 2000 Apr;11(4):221-9.
110. Koshizuka K, Koike M, Asou H, Cho SK, Stephen T, Rude RK, Binderup L, Uskokovic M, Koeffler HP. Combined effect of vitamin D3 analogs and paclitaxel on the growth of MCF-7 breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res Treat*. 1999 Jan;53(2):113-20.
111. Schuster I. Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jul 7.
112. Bhowmick NA, Moses HL. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev*. 2005 Feb;15(1):97-101. Review.
113. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallett M, Park M. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med*. 2008 May;14(5):518-27.
114. Sun J, Kong J, Duan Y, Szeto FL, Liao A, Madara JL, Li YC. Increased NF-kappaB activity in fibroblasts lacking the vitamin D receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Aug;291(2):E315-22.
115. Artaza JN, Sirad F, Ferrini MG, Norris KC. 1,25(OH)₂vitamin D3 inhibits cell proliferation by promoting cell cycle arrest without inducing apoptosis and modifies cell morphology of mesenchymal multipotent cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010 Mar;119(1-2):73-83.
116. Guzey M, Luo J, Getzenberg RH. Vitamin D3 modulated gene expression patterns in human primary normal and cancer prostate cells. *J Cell Biochem*. 2004 Oct 1;93(2):271-85.
117. Pramanik R, Qi X, Borowicz S, Choubey D, Schultz RM, Han J, Chen G. p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun. The determinant roles of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity. *J Biol Chem*. 2003 Feb 14;278(7):4831-9.
118. Schuster I. Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jul 7.
119. Kemmis CM, Salvador SM, Smith KM, Welsh J. Human mammary epithelial cells express CYP27B1 and are growth inhibited by 25-hydroxyvitamin D-3, the major circulating form of vitamin D-3. *J Nutr*. 2006 Apr;136(4):887-92.
-

-
120. Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW, Pinkel D. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):144-6.
121. Colston KW, Lowe LC, Mansi JL, Campbell MJ. Vitamin D status and breast cancer risk. *Anticancer Res.* 2006 Jul-Aug;26(4A):2573-80
122. Li F, Ling X, Huang H, Brattain L, Apontes P, Wu J, Binderup L, Brattain MG. Differential regulation of survivin expression and apoptosis by vitamin D3 compounds in two isogenic MCF-7 breast cancer cell sublines. *Oncogene.* 2005 Feb 17;24(8):1385-95
123. Lipponen P, Pietiläinen T, Kosma VM, Aaltomaa S, Eskelinen M, Syrjänen K. Apoptosis suppressing protein bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *J Pathol.* 1995 Sep;177(1):49-55.
124. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003 Nov 24;22(53):8590-607. Review.
125. Welch C, Santra MK, El-Assaad W, Zhu X, Huber WE, Keys RA, Teodoro JG, Green MR. Identification of a protein, G0S2, that lacks Bcl-2 homology domains and interacts with and antagonizes Bcl-2. *Cancer Res.* 2009 Sep 1;69(17):6782-9. Epub 2009 Aug 25.
126. Saras J, Wollberg P, Aspenström P. Wrch1 is a GTPase-deficient Cdc42-like protein with unusual binding characteristics and cellular effects. *Exp Cell Res.* 2004 Oct 1;299(2):356-69.
127. Nobes C, Hall A. Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. *Curr Opin Genet Dev.* 1994 Feb;4(1):77-81. Review.
128. Ridley AJ. Signal transduction through the GTP-binding proteins Rac and Rho. *J Cell Sci Suppl.* 1994;18:127-31. Review.
129. L. Kjølner, A. Hall, Signaling to Rho GTPases, *Exp. Cell Res.* 253 (1999) 166– 179.
130. Chuang YY, Valster A, Coniglio SJ, Backer JM, Symons M. The atypical Rho family GTPase Wrch-1 regulates focal adhesion formation and cell migration. *J Cell Sci.* 2007 Jun 1;120(Pt 11):1927-34.
131. Tao W, Pennica D, Xu L, Kalejta RF, Levine AJ. Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1. *Genes Dev.* 2001 Jul 15;15(14):1796-807.
132. Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Sep;9(9):690-701. Review.
133. M.D. Vos, C.A. Ellis, C. Elam, A.S. Ulku, B.J. Taylor, G.J. Clark, RASSF2 is a novel K-Ras-specific effector and potential tumor suppressor, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 28045–28051.
134. Z. Zhang, D. Sun, N. Van do, A. Tang, L. Hu, G. Huang, Inactivation of RASSF2A by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma, *Int. J. Cancer* 120 (2007) 32–38.
135. A. Moshnikova, J. Frye, J.W. Shay, J.D. Minna, A.V. Khokhlatchev, The growth and tumor suppressor NORE1A is a cytoskeletal protein that suppresses growth by inhibition of the ERK pathway, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 8143–8152.
136. Forrester E, Chytil A, Bieri B, Aakre M, Gorska AE, Sharif-Afshar AR, Muller WJ, Moses HL. Effect of conditional knockout of the type II TGF-beta receptor gene in mammary epithelia on mammary gland development and polyomavirus middle T antigen induced tumor formation and metastasis. *Cancer Res.* 2005 Mar 15;65(6):2296-30
-

137. Brier B, Moses HL. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 Feb;21(1):49-59. Epub 2009 Dec 16. Review.
138. Yang L, Yang J, Venkateswarlu S, Ko T, Brattain MG. Autocrine TGFbeta signaling mediates vitamin D3 analog-induced growth inhibition in breast cells. *J Cell Physiol.* 2001 Sep;188(3):383-93.
139. Townsend K, Trevino V, Falciani F, Stewart PM, Hewison M, Campbell MJ. Identification of VDR-responsive gene signatures in breast cancer cells. *Oncology.* 2006;71(1-2):111-23.
140. Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2007 Sep 15;13(18 Pt 1):5262-70. Review.
141. Opolski A, Wietrzyk J, Chrobak A, Marcinkowska E, Wojdat E, Kutner A, Radzikowski C. Antiproliferative activity in vitro of side-chain analogues of calcitriol against various human normal and cancer cell lines. *Anticancer Res.* 1999 Nov-Dec;19(6B):5217-22.
142. Wietrzyk J, Chodyński M, Fitak H, Wojdat E, Kutner A, Opolski A. Antitumor properties of diastereomeric and geometric analogs of vitamin D3. *Anticancer Drugs.* 2007 Apr;18(4):447-57.
143. Matthews D, LaPorta E, Zinser GM, Narvaez CJ, Welsh J. Genomic vitamin D signaling in breast cancer: Insights from animal models and human cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 Jul;121(1-2):362-7.
144. Kovalenko PL, Zhang Z, Cui M, Clinton SK, Fleet JC. 1,25 dihydroxyvitamin D-mediated orchestration of anticancer, transcript-level effects in the immortalized, non-transformed prostate epithelial cell line, RWPE1. *BMC Genomics.* 2010 Jan 13;11:26.
145. Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, Bourdeau V, Konstorum A, Lallemant B, Zhang R, Mader S, White JH. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol.* 2005 Nov;19(11):2685-95.
146. Murakami Y, Kohsaka H. [Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as an inflammation amplifier]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 2009 Aug;32(4):242-8. Review.
147. Tessarz AS, Cerwenka A. The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunol Lett.* 2008 Mar 15;116(2):111-6. Epub 2007 Dec 26. Review.
148. Martinez-Moczygemba M, Huston DP. Immune dysregulation in the pathogenesis of pulmonary alveolar proteinosis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2010 Sep;10(5):320-5.
149. Mirza S, Walker A, Chen J, Murphy JM, Young IG. The Ig-like domain of human GM-CSF receptor alpha plays a critical role in cytokine binding and receptor activation. *Biochem J.* 2010 Feb 24;426(3):307-17.
150. Tsugane S, Inoue M. Insulin resistance and cancer: epidemiological evidence. *Cancer Sci.* 2010 May;101(5):1073-9. Epub 2010 Feb 3. Review.
151. Sukhanov S, Higashi Y, Shai SY, Vaughn C, Mohler J, Li Y, Song YH, Titterton J, Delafontaine P. IGF-1 reduces inflammatory responses, suppresses oxidative stress, and decreases atherosclerosis progression in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Dec;27(12):2684-90.
152. Liao D, Luo Y, Markowitz D, Xiang R, Reisfeld RA. Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One.* 2009 Nov 23;4(11):e7965.
-

153. Udabage L, Brownlee GR, Waltham M, Blick T, Walker EC, Heldin P, Nilsson SK, Thompson EW, Brown TJ. Antisense-mediated suppression of hyaluronan synthase 2 inhibits the tumorigenesis and progression of breast cancer. *Cancer Res.* 2005 Jul 15;65(14):6139-50.
 154. Udabage L, Brownlee GR, Nilsson SK, Brown TJ. The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Exp Cell Res.* 2005 Oct 15;310(1):205-17.
 155. Li Y, Li L, Brown TJ, Heldin P. Silencing of hyaluronan synthase 2 suppresses the malignant phenotype of invasive breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2007 Jun 15;120(12):2557-67.
 156. Rabenau KE, O'Toole JM, Bassi R, Kotanides H, Witte L, Ludwig DL, Pereira DS. DEGA/AMIGO-2, a leucine-rich repeat family member differentially expressed in human gastric adenocarcinoma: effects on ploidy, chromosomal stability, cell adhesion/migration and tumorigenicity. *Oncogene.* 2004 Jun 24;23(29):5056-67.
 157. Mori M, Murata Y, Kotani T, Kusakari S, Ohnishi H, Saito Y, Okazawa H, Ishizuka T, Mori M, Matozaki T. Promotion of cell spreading and migration by vascular endothelial-protein tyrosine phosphatase (VE-PTP) in cooperation with integrins. *J Cell Physiol.* 2010 Jul;224(1):195-204.
 158. Anderberg C, Li H, Fredriksson L, Andrae J, Betsholtz C, et al. Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2009;69:369–378
 159. Lee HJ, Liu H, Goodman C, Ji Y, Maehr H, Uskokovic M, Notterman D, Reiss M, Suh N. Gene expression profiling changes induced by a novel Gemini Vitamin D derivative during the progression of breast cancer. *Biochem Pharmacol.* 2006 Jul 28;72(3):332-43.
 160. Swami S, Raghavachari N, Muller UR, Bao YP, Feldman D. Vitamin D growth inhibition of breast cancer cells: gene expression patterns assessed by cDNA microarray. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Jul;80(1):49-62.
 161. Richard CL, Farach-Carson MC, Rohe B, Nemere I, Meckling KA. Involvement of 1,25D3-MARRS (membrane associated, rapid response steroid-binding), a novel vitamin D receptor, in growth inhibition of breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 2010 Mar 10;316(5):695-703.
-