Paulo Roberto Del Valle

**Perfil transcricional de fibroblastos de tumor primário,
linfonodo e medula óssea de pacientes com câncer de mama**

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof^a Maria Aparecida Azevedo Koike
Folgueira

São Paulo - SP

2012

Paulo Roberto Del Valle

**Perfil transcricional de fibroblastos de tumor primário,
linfonodo e medula óssea de pacientes com câncer de mama**

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof^a Maria Aparecida Azevedo Koike
Folgueira

São Paulo - SP

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Del Valle, Paulo Roberto

Perfil transcricional de fibroblastos de tumor primário, linfonodo e medula óssea de
pacientes com câncer de mama / Paulo Roberto Del Valle. -- São Paulo, 2012.

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Microambiente tumoral 3.Fibroblastos
4.Análise do padrão da expressão gênica 5.Medula óssea 6.Células mesenquimais
estromais 7.Linfonodos

USP/FM/DBD-392/12

Às pacientes que sofrem de câncer de mama,

Aos meus pais pelo suporte e apoio,

À minha família.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira, por sua orientação e por compartilhar comigo o seu conhecimento, contribuindo grandemente para minha formação acadêmica.

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

À Dra. Maria Lúcia Hirata Katayama pelo privilégio de sua atenção em algumas etapas deste trabalho e, especialmente, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Igor Moyses Longo Snitcovsky, pelas discussões e colaborações que contribuíram não só para a realização deste estudo, mas também para minha formação acadêmica.

Aos amigos Adriana Priscila Trapê, Yuri Nagamine Urata, Laura T Campos, Cíntia Milani, Simone Crestoni, Vitor Celso, Giselly Encinas, Natália Bromberg, Mateus Barros Filho, Heitor Carvalho, Danielle Fontes de Almeida, Rita C. B. Castro, Thiago Salles e Ruan Medrano pelas colaborações em diversos momentos, ajuda em todos os momentos de convivência e trabalho, e principalmente, pela amizade.

À Dra. Rosimeire Roela por seus ensinamentos sobre cultura celular e contribuições em algumas etapas deste trabalho.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento deste projeto.

A Deus, pelas suas misericórdias, pelo seu amor, pela sua graça.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras e Tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
2. Objetivos	13
3. Justificativa	13
4. Casuística e Métodos	14
4.1. Descrição das Pacientes	14
4.2. Tecnologia do cDNA “microarray”	16
4.3. Análise matemática para seleção dos genes identificados como diferencialmente expressos por “microarrays”	17
4.4. Cultura de células estromais derivadas de tumor primário, linfonodo comprometido e medula óssea de pacientes com câncer de mama	19
4.4.1. Banco de célula de cultura primária	19

4.4.2. Cultura primária de fibroblastos	20
4.5. Extração de RNA	21
4.6. Reação de Transcriptase Reversa (RT) para obtenção de cDNA	22
4.7. Desenho dos “primers”	23
4.8. Reação em cadeia da polimerase em tempo real	23
4.9. Avaliação da expressão dos genes	24
4.10. Análise estatística	24
5. Resultados	25
5.1. Perfil de expressão gênica de células estromais de pacientes com câncer de mama	25
5.1.1. Genes diferencialmente expressos entre os três sítios	25
5.1.2. Genes diferencialmente expressos entre CAF e N+	28
5.1.3 Genes diferencialmente expressos entre CAF e BMMC	28
5.1.4. Genes diferencialmente expressos entre N+ e BMMC	29

5.2. Genes diferencialmente expressos entre comparações por fatores clínicos	32
5.3. Agrupamento de funções e seleção de genes candidatos	33
5.4. RT-qPCR	39
6. Discussão	50
6.1. Perfil de expressão gênica de células estromais de diferentes origens	50
6.1.1. Genes diferencialmente expressos entre fibroblastos	50
6.1.2. Genes diferencialmente expressos entre CAF e N+	53
6.1.3. Genes diferencialmente expressos em BMMC	55
6.2. Expressão gênica por características clínicas	62
7. Conclusão	65
8. Anexos	66
9. Referências	94

Lista de Abreviaturas

ATCC	– do Inglês <i>American Type Culture Collection</i>
BMMC	– Células mesenquimais derivadas da medulla óssea
Ca	– carcinoma
CAF	– Fibroblastos associados ao tumor
cDNA	– DNA complementar
cm ²	– centímetros quadrados
CO ₂	– Dióxido de carbono
°C	– graus Celsius
Cy3-dCTP	– 5-Amino-propargyl-2'-deoxycytina5'- trifosfato acoplado a corante fluorescente Cy3 (verde)
Cy5-dCTP	– 5-Amino-propargyl-2'-deoxycytina5'- trifosfato acoplado a corante fluorescente Cy5 (vermelho)
DEPEC	– dietilpirocarbonato
DMEM	– Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DMSO	– dimetilsulfóxido
DNA	– ácido desoxirribonucléico
dNTP	– desoxiribonucleotídeos
DTT	– ditioneitol
EGF	– fator de crescimento epidérmico
EMA	– antígeno de membrana epitelial
ER	– receptor de estrógeno
c-ErbB2	– homólogo 2 do oncogene viral de leucemia eritroblástica
FGF	– fator de crescimento de fibroblasto
FSP	– Proteína específica de fibroblasto
g	– força da gravidade (aceleração centrípeta)
Hb4a	– linhagem celular epitelial mamária humana derivada de mamoplastia imortalizada pela transfecção do antígeno T grande do vírus SV40

HGF	– fator de crescimento de hepatócito
IGF-I	– fator de crescimento insulina-símile-1
M	– molar
MCF-7	– linhagem celular epitelial mamária humana bem diferenciada derivada de infusão pleural de adenocarcinoma
MCF-10A	– linhagem celular epitelial mamária humana não tumorigênica
MDA-MB231	– linhagem celular epitelial mamária humana derivada de infusão pleural de adenocarcinoma
MDA-MB435	– linhagem celular epitelial mamária humana derivada de efusão pericardica
mg	– miligrama
ml	– mililitro
mM	– milimolar
MMP	– metaloprotease da matriz
NAF	– Fibroblasto de tecido normal adjacente
NbF-1	– linhagem de fibroblastos de próstata de rato
ng	– nanogramas
nm	– nanometro
N+	– Fibroblastos obtidos de metástase linfonodal
ORESTES	– do Inglês <i>Open Reading Frame Expressed sequence Tags</i>
pb	– pares de bases
PDGF	– fator de crescimento derivado de plaqueta
PMP22	– codifica proteína 22 da mielina periférica
PR	– receptor de progesterona
qRT-PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA	– ácido ribonucléico
RNA _m	– ácido ribonucléico mensageiro
rNTP	– ácido ribonucléico ribossomal
RPMI	– meio de cultura do Roswell Park Memorial Institute

RT	– enzima Transcriptase Reversa
RT-qPCR	– reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa
TGF-beta	– fator de crescimento transformante beta
TGF-alfa	– fator de crescimento transformante alfa
TNM	– Tumor, Node and Metastatic
UI	– Unidade internacional
UICC	– International Union Against Cancer
VEGF	– Fator de crescimento endotelial vascular
µg	– microgramas
µl	– microlitros
µM	– micromolar

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1	Descrição das pacientes	15
Anexo Tabela 1	Genes diferencialmente expressos entre fibroblastos derivados de câncer de mama (CAF), fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos (N+) e células estromais derivadas da medula (BMMC)	66
Anexo Tabela 2	Comparação de dados de perfil de expressão gênica de acordo com características clínicas	75
Anexo Tabela 3	Funções enriquecidas entre os 267 genes diferencialmente expressos entre CAF, N+ e BMMC	76
Anexo Tabela 4	Funções enriquecidas entre os genes diferencialmente menos expressos em CAFs quando comparados com N+	77
Anexo Tabela 5	Funções enriquecidas entre os genes diferencialmente mais expressos em CAFs quando comparados com N+	79
Anexo Tabela 6	Funções enriquecidas entre os genes diferencialmente menos expressos em CAFs quando comparados com BMMC	80
Anexo Tabela 7	Funções enriquecidas entre os genes diferencialmente mais expressos em CAFs quando comparados com BMMC	83
Anexo Tabela 8	Funções enriquecidas entre os genes diferencialmente menos expressos em N+ quando comparados com BMMC	85
Anexo Tabela 9	Funções enriquecidas entre os genes diferencialmente mais expressos em N+ quando comparados com BMMC	88
Anexo Tabela 10	Agrupamento de funções enriquecidas entre os genes diferencialmente expressos nos três sítios (tumor primário, linfonodo e medula óssea)	90
Anexo Tabela 11	Valores dos Coeficientes de Correlação de Pearson entre os dados obtidos pelo “microarray” e os dados obtidos por RT-qPCR	91
Figura 1	Agrupamento hierárquico dos 267 genes diferencialmente expressos	27
Figura 2	Diagrama de Venn agrupando os genes diferencialmente expressos de acordo com sua origem	31
Figura 3	Agrupamento hierárquico entre os genes envolvidos em morfogênese, embriogênese e desenvolvimento	37

Figura 4	Rede de interação proteína-proteína entre os 31 genes envolvidos em diferenciação	38
Figura 5	Expressão gênica em CAF vs. BMMC (validação biológica)	41
Figura 6	Expressão gênica em N+ vs. BMMC (validação biológica)	43
Figura 7	Expressão gênica em CAF vs. N+ (validação biológica)	45
Figura 8	Comparação CAF vs. BMMC	47
Anexo Figura 1	Os 5% melhores genes “brokers”	92
Anexo Figura 2	Os 5% melhores genes “bridges”	93

Resumo

Del Valle PR. Perfil transcricional de fibroblastos de tumor primário, linfonodo e medula óssea em pacientes com câncer de mama. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Introdução: Em câncer de mama, existem evidências de que o microambiente pode influenciar o desenvolvimento do tumor no sítio primário, bem como em metástases regionais e a distância. Neste contexto, fibroblastos são importantes células estromais que podem influenciar a proliferação e a migração de células do câncer e podem prover um nicho apropriado para o desenvolvimento tumoral.

Objetivos: O principal objetivo deste trabalho é comparar células estromais obtidas do tumor primário (PT), metástase linfonodal (N+) e medula óssea (BM) de pacientes com câncer de mama, através do perfil de expressão gênica.

Pacientes e Métodos: Foi analisada a expressão gênica de fibroblastos (cultura primária) de 11 pacientes com câncer de mama. O perfil de expressão foi determinado em PT (n=4), N+(n=3) e BM (n=4) através de uma plataforma de cDNA “microarray” customizada (contendo 4.800 sequências imobilizadas, representando cerca de 4600 genes), e os genes diferencialmente expressos foram identificados pelo teste SAM multiclasse, seguido pelo teste SAM de duas classes (TMEV, FDR 0%). A análise funcional foi realizada pelo software DAVID v6.7. Validação técnica foi realizada em 6 amostras previamente analisadas no microarray e a validação biológica em fibroblastos obtidos de outros 16 pacientes utilizando-se de RT-qPCR.

Resultados: O perfil de expressão gênica dos fibroblastos obtidos de diferentes sítios mostraram 267 genes diferencialmente expressos, os quais apropriadamente agruparam os fibroblastos de acordo com suas origens (PT vs. N+ vs. BM). Apesar das diferenças entre PT e N+ serem representadas por 20 genes, as diferenças entre PT vs. BM e N+ vs. BM foram mais significantes (235 e 245 genes diferencialmente expressos respectivamente). Análise funcional dos genes diferencialmente expressos mostrou enriquecimento de funções relacionadas ao desenvolvimento e morfogênese. A seguir, a expressão de alguns genes selecionados foi analisada em uma série diferente de amostras (validação biológica). Desse modo observamos que NOTCH2 confirmou uma alta expressão em N+ (vs. PT), e ADCY2, HECTD1, HNMT, LOX, MACF1 e USP16 confirmaram alta expressão em BM (vs. PT).

Conclusão: Em pacientes com câncer de mama, células estromais obtidas de diferentes origens apresentam um perfil de expressão gênica diferencial, o qual pode influenciar o comportamento do tumor.

Descritores: Neoplasias da mama, microambiente tumoral. Fibroblastos, análise do padrão de expressão gênica, medula óssea, células mesenquimais estromais, linfonodo.

Abstract

Del Valle PR. Transcriptional profile of fibroblasts obtained from primary tumor, lymph node and bone marrow of breast cancer patients.[dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

Background: There is an increasing evidence that the microenvironment may influence tumor development in the primary site of breast cancer, as well as in regional and distant metastatic sites. In this context, fibroblasts are important stromal cells which influence proliferation and migration of cancer cells and may also provide an appropriate niche to tumor development.

Objectives: The main objective of this work is the comparison of stromal cells from the primary tumor (PT), lymph node metastasis (N+) and bone marrow (BM) obtained from breast cancer patients, through gene expression profile.

Patients and Methods: The gene expression profile was analyzed in fibroblasts primary culture from 11 breast cancer patients. The expression profiles of PT cells (n=4), N+ cells (n=3) and BM cells (n=4) were determined through a customized cDNA microarray platform (containing 4800 immobilized sequences which represents 4600 genes approximately). The analysis were performed by SAM multiclass (TMEV; FDR 0%), followed by SAM two classes test (TMEV; FDR 0%). Functional analysis was performed using DAVID v6.7. Technical validation was performed in same 6 samples that were previously analyzed in “microarray” experiments and biological validation was performed in fibroblasts obtained from other group of 16patients by RT-qPCR

Results: The expression profile of fibroblasts obtained from three sites revealed 267 differentially expressed genes, which appropriately clustered fibroblasts in three different branches, in accordance with their origin (PT vs. N+ vs. BM). Although the differences between PT and N+ were represented by 20 genes, differences between PT vs. BM and N+ vs. BM were more significant (235 and 245 differentially expressed genes respectively). Functional analysis revealed enrichment of functions related to development and morphogenesis. Afterwards, the expression of some selected genes were analyzed in a different batch of samples (biological validation). Thereby, NOTCH2 confirmed high expression in N+ (vs. PT), and ADCY2, HECTD1, HNMT, LOX, MACF1 and USP16 confirmed high expression in BM (vs. PT).

Conclusion: In breast cancer patients, stromal cells obtained from different origins present a differential gene expression profile, which may influence tumor behavior.

Descriptors: Breast neoplasm, tumor microenvironment, fibroblasts, gene expression profiling, bone marrow, mesenchymal stromal cells, lymph node.

1. Introdução

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente mundialmente, e o primeiro entre as mulheres. Em 2012 são estimados 52.680 novos caso apenas no Brasil e apesar de considerado de bom prognóstico, as taxas de mortalidade por este tipo de câncer continuam elevadas (INCA, 2012). A maioria das mortes por câncer de mama se deve ao estágio avançado da doença, diagnosticado quando a células tumorais se disseminaram para os linfonodos ou órgãos distantes.

Uma das hipóteses é que a metástase representa um processo altamente organizado, não randômico e órgão seletivo, sendo o resultado de várias etapas como invasão, sobrevivência no sistema circulatório e colonização de órgãos distantes (Steeg, 2006). A disseminação das células tumorais pode ocorrer por via linfática ou hematogênica. Para isso, as células tumorais precisam romper a membrana basal, invadir os tecidos adjacentes, migrar para a linfa, se estabelecer nos linfonodos, sobreviver na circulação sanguínea e disseminar para medula óssea, pulmão e cérebro.

Na disseminação linfática, as células chegam aos linfonodos regionais e levam a formação de tumores nos linfonodos. Entre os eventos metastáticos do câncer de mama, a metástase linfonodal possui um papel chave, principalmente quando o envolvimento linfático axilar determina o prognóstico da paciente. Apenas 20-30% das pacientes que não apresentam comprometimento linfonodal desenvolverão recorrência em 10 anos, comparados a 70% das pacientes com linfonodos comprometidos

(Fitzgibbons, *et al.* 1999). O número absoluto de linfonodos comprometidos também tem importância prognóstica, sendo que pacientes com mais de quatro linfonodos comprometidos possuem um pior prognóstico quando comparadas com pacientes com menos de quatro linfonodos comprometidos (Fitzgibbons, *et al.* 1999). Além disso, a razão entre o número de linfonodos dissecados e o número de linfonodos comprometidos também estava associada à sobrevida global, pois o grupo de pacientes com razão superior a 0,65 apresentou taxa de sobrevida global de cinco anos de 52,7% comparados a 83,1% para o grupo com razão entre 0,01 a 0,2 (Schiffman, *et al.* 2011).

Contudo, quando as células malignas atingem a via hematogênica, tornam-se responsáveis pelo desenvolvimento de metástase à distância, principalmente em ossos, fígado e pulmão. Outro dado importante é que a presença de micrometástase na medula óssea ao diagnóstico do câncer de mama está associada a um prognóstico ruim. Em uma meta-análise que avaliou a presença de micrometástase na medula óssea no momento do diagnóstico do câncer de mama, observou-se que cerca de 30% das pacientes apresentavam micrometástases. Estas pacientes apresentaram tumores maiores e com alto grau histológico. Além disso, as metástases linfonodais eram mais frequentes e apresentaram uma maior quantidade de tumores receptores hormonais negativos. Observou-se também que as maiores taxas de risco relativo de morte, recidiva e metástase à distância estiveram entre pacientes positivas para micrometástase na medula óssea (Braun, *et al.* 2005).

Apesar do crescente número de estudos, ainda não está claro quando e quais fatores podem ser preditivos para o desenvolvimento da metástase. Existem algumas hipóteses para essa questão, e uma delas é que alguns tumores possuem características intrínsecas que favorecem o processo metastático. Essa hipótese é reforçada por estudos que observaram, no tumor primário, um perfil transcricional capaz de distinguir tumores com características metastáticas (Veer, *et al.* 2002; Abba, *et al.* 2007; Woelfle, *et al.* 2003).

Um estudo, que avaliou o perfil transcricional de 117 tumores primários de pacientes diagnosticadas com câncer de mama em idade inferior a 55 anos, identificou uma assinatura gênica com forte poder preditivo de um intervalo curto para metástase à distância em pacientes com linfonodos negativos ao diagnóstico. Essa assinatura gênica continha genes envolvidos na regulação do ciclo celular, invasão, metástase e angiogênese (Veer, *et al.* 2002). Outro estudo também analisando o perfil transcricional de 27 carcinomas ductais invasivos primários pôde identificar uma assinatura gênica que agrupava os tumores de acordo com o comprometimento linfonodal. Estes genes parecem estar envolvidos em vias de sinalização relacionadas à invasão dos linfonodos axilares (Abba, *et al.* 2007).

Ainda, outro grupo identificou um perfil transcricional capaz de classificar tumores primários com relação à presença ou não de micrometástase na medula óssea (73 genes), ou comprometimento linfonodal (40 genes). Entre as funções reguladas estão a de remodelamento

de matriz extracelular, plasticidade do citoesqueleto, e vias de sinalização (Woelfle, *et al.* 2003).

Outra hipótese é que existe a possibilidade de que algumas células do tumor primário adquiram a capacidade de sobreviver em outros órgãos, por possuírem um perfil genômico diferenciado. A análise por sequenciamento de nova geração de amostras de DNA de uma paciente afro-americana, obtidas do sangue periférico, tumor primário, metástase cerebral e um xenoenxerto derivado do tumor primário, revelou que a metástase possuía duas mutações *de novo*, e uma ampla deleção não presente no tumor primário, e estava enriquecida para 20 mutações compartilhadas com o tumor primário. Estas observações indicam que houve seleção de uma população de células com tendência metastática somada a alterações genéticas adicionais que favoreceriam o desenvolvimento do tumor em outros órgãos (Ding, *et al.* 2010).

Porém, estudos em câncer, e em especial câncer de mama, têm apontado uma grande importância do microambiente na iniciação e progressão da doença. Células tumorais estão em íntimo contato com a matriz extracelular e células não transformadas, como células mioepiteliais, endoteliais, miofibroblastos, fibroblastos, além de células do sistema imune. Todos esses componentes do estroma podem interagir, estimular o crescimento tumoral e até facilitar a disseminação para órgãos distantes (Joyce e Pollard, 2009; Polyak e HU, 2008).

Dentre as células estromais, os fibroblastos representam constituintes mais frequentes. Descritos inicialmente no final do século 19, baseado em

sua localização e morfologia, os fibroblastos são células não vasculares, não epiteliais e não inflamatórias e, quando em cultura, assumem morfologia fusiforme (Kalluri e Zeisberg, 2006).

Não existe um marcador exclusivo de fibroblastos, por isso a caracterização destas células é realizada por vários marcadores, como vimentina, desmina e alfa-actina de músculo liso e proteínas associadas a filamentos intermediários. Vimentina está presente em fibroblastos de várias origens, desmina em fibroblastos de pele, e a alfa-actina de músculo liso é característica de miofibroblastos (Kalluri e Zeisberg, 2006). Estes marcadores mostram que dependendo da região de origem dos fibroblastos, eles apresentam uma característica fenotípica diferenciada. De acordo com esta observação, a análise do perfil de expressão gênica de 15 culturas de fibroblastos originados de 10 sítios diferentes de 16 doadores, mostrou que os fibroblastos, apesar de possuírem características morfológicas muito semelhantes, quando originados de diferentes órgãos apresentaram características moleculares distintas, sugerindo que os fibroblastos originados de cada sítio poderiam ser considerados células diferentes (Chang, *et al.* 2002).

Os fibroblastos exercem diversas funções, como remodelamento, manutenção da matriz extracelular e cicatrização. Quando fibroblastos migram para a lesão, expressam proteínas de adesão como beta1-integrina, alfa-actina de músculo liso, entre outras proteínas de contração (Liu, *et al.* 2010). Além de proteínas de matriz e de adesão celular, fibroblastos produzem fatores de ação parácrina, como TGF-beta, EGF, FGF-2, PDGF e

VEGF, que coordenam diversas células para o restauro da lesão (Barrientos, *et al.* 2008). Estes fibroblastos são chamados de ativados.

Os fibroblastos também estão em íntimo contato com as células tumorais. Neste caso, é possível que as células tumorais induzam estresse oxidativo nos fibroblastos adjacentes, levando-os a ativação. Foi descrito que esse mecanismo de ativação dos fibroblastos influencia o metabolismo do tumor, sendo então proposto um modelo chamado “Efeito Warburg Reverso”. Neste modelo as células tumorais induzem autofagia nas células estromais, que liberam nutrientes (lactato e piruvato) diretamente para o metabolismo mitocondrial da célula tumoral (Martinez-Outschoorn, *et al.* 2010).

Há evidências de que fibroblastos tumorais influenciam o desenvolvimento e progressão da doença. A presença de reação desmoplásica em focos fibróticos (regiões com fibroblastos altamente proliferativos) demonstra a importância clínica de estudos avaliando a influência dos fibroblastos, pois esta informação pode ser usada no prognóstico do câncer de mama (Eynden, *et al.* 2007). Em um dos estudos, demonstrou-se a presença de mutações de TP53 em fibroblastos que infiltram o tumor em 25% dos casos esporádicos de câncer de mama. Este achado foi associado à detecção de metástase linfonodal (Patocs, *et al.* 2007). Além disso, o estroma pode possuir marcadores importantes, como a perda da expressão de caveolina-1 (Cav-1) em câncer de mama, associando-se com um prognóstico ruim. Sendo que pacientes com tumores positivos para Cav-1 têm 91% de taxa de sobrevida em 10 anos,

comparados a 43% em pacientes com tumores Cav-1 negativos (Sloan, *et al.* 2009). Outro estudo avaliou a presença de figuras mitóticas em fibroblastos adjacentes ao tumor e apontou uma relação com a habilidade metastática do carcinoma ductal invasivo. A atividade proliferativa dos fibroblastos poderia influenciar a capacidade metastática das células tumorais, sendo que a marcação positiva para Ki67 em fibroblastos intratumorais aumentaria o risco relativo de metástase linfonodal e metástase à distância (Hasebe e Sasaki, 2000).

Podemos citar vários estudos em que fibroblastos ativados estimulam a proliferação e invasão. Dentre as moléculas sintetizadas por fibroblastos que podem ser mediadoras desses processos, observa-se que a indução da expressão de LIMK (“LIM kinases” 1 e 2), uma proteína reguladora da dinâmica do citoesqueleto de actina, está associada à ativação de vias que levam células tumorais e estromais à invasão coletiva (Scott, *et al.* 2010). É possível também que a perda da expressão de TIAM1 (“T-cell lymphoma invasion and metastasis 1”) em fibroblastos induza a migração e invasão de células tumorais de mama (Xu, *et al.* 2010). Além disso, Células MCF7S1 co-cultivadas com fibroblastos de mama HMF3s, tiveram sua habilidade migratória aumentada, associada ao aumento da expressão do promotor de metástase S100A4 (“S100 calcium binding protein A4”), estimulação da atividade de metaloproteinases (MMP-2), e liberação de várias citocinas (Olsen, *et al.* 2010).

Ainda, a perda de moléculas supressoras tumorais no compartimento estromal pode ter um papel importante na carcinogênese. Um estudo

mostrou que a inibição específica nos fibroblastos mamários de PTEN (“phosphatase and tensin homolog”) em camundongos acelerou a iniciação, progressão e malignidade de tumores epiteliais mamários. Essa deleção resultou em remodelamento da matriz extracelular e da vasculatura tumoral e recrutamento de células do sistema imune inato. Ainda o perfil de expressão gênica desses fibroblastos identificou a ativação de um programa transcricional Ets2 específico. Dessa maneira, a inativação de Ets2 no compartimento estromal reverteu o aumento da malignidade provocada pela deficiência de PTEN. (Trimboli, *et al.* 2009).

Porém poucos estudos avaliaram a influência do microambiente de sítios metastáticos nas células malignas. Em 1889, Stephen Paget hipotetizou que as células tumorais seriam “sementes” que cresceriam apenas nos “solos” apropriados. Esta observação predizia que o microambiente tecidual alvo da metástase, composto por várias células especializadas, matriz extracelular e células recrutadas para o local, poderiam contribuir para a seletividade de órgãos durante a colonização metastática (Steeg, 2006).

Sendo assim, em um estudo de perfil de expressão gênica foram encontrados 79 genes diferencialmente expressos entre células tumorais da metástase linfonodal e do tumor primário de mama. Esses genes puderam separar as amostras primárias das metástases, predizer o resultado clínico de pacientes com câncer de mama linfonodo positivos e estavam envolvidos em diversas etapas da metástase (Feng, *et al.* 2007). Porém é difícil entender se essas alterações são produtos de uma população específica do

tumor primário ou se é o resultado da interação das células tumorais com o microambiente metastático.

Por outro lado, um estudo comparando a expressão de biomarcadores tanto no tumor de mama quanto na metástase linfonodal observou um alto grau de concordância entre os marcadores para ER (95%), PR (84%), c-ErbB2 (97%) e Ki67 (85%). Os casos discordantes para c-ErbB2 eram todos negativos no tumor primário, porém positivos na metástase linfonodal. Além disso, a análise de sobrevida mostrou que a expressão dos biomarcadores na metástase linfonodal poderia suprir as informações prognósticas quando não existe a possibilidade de se analisar o tumor primário (Falck, *et al.* 2010).

Em contrapartida, o microambiente da medula óssea também pode ser favorável à metástase. Um estudo mostrou que a co-cultura de células estromais derivadas da medula óssea normal, obtidos de pacientes submetidas à cirurgia plástica e co-cultivados com células de câncer de mama MCF7, promoveram um aumento na proliferação e migração das células de câncer de mama, indicando que o microambiente da medula óssea pode contribuir para a sobrevivência da célula tumoral (Koro, *et al.* 2010). Porém, células derivadas da medula óssea parecem não influenciar a proliferação de células normais (Fierro, *et al.* 2004). Uma das moléculas que podem mediar à interação entre a célula tumoral e a célula estromal de medula óssea é a caderina 11 e interações mediadas por esta molécula aumentam a frequência de células tumorais na medula óssea de camundongos (Tamura, *et al.* 2008).

Apesar de alguns estudos mostrarem interação mútua entre fibroblastos e células tumorais, a maioria deles analisa apenas a ação dos fibroblastos no comportamento das células tumorais, e não o contrário. Demonstrou-se que células estromais originárias de pulmão, fígado e osso estimulam a proliferação e invasão de células MCF7, e que interleucina 6 (IL6) é um possível mediador destes processos na célula cancerosa. Além disso, camundongos que receberam fibroblastos de pele senescentes, produtores de IL6, juntamente com células MCF7 produziram tumores, enquanto aqueles que receberam fibroblastos pré-senescentes falharam em produzir tumores (Studebaker, *et al.* 2008).

Por outro lado, um estudo envolvendo seis casos de câncer de mama, avaliou o perfil de expressão gênica (Affymetrix) em cultura primária de fibroblastos associados ao tumor (CAF) contra a cultura primária de fibroblastos de tecido normal adjacente (NAF). Tanto CAFs e NAFs apresentavam expressão de FSP1, mas a expressão de alfa actina de músculo liso foi maior em quatro de seis casos em CAFs. A análise não supervisionada do perfil não pode discriminar o agrupamento entre CAFs e NAFs. Neste caso, foram observados 21 genes mais expressos em CAFs versus NAFs, entre as funções conhecidas moduladas por esses genes estão sinalização parácrina, sinalização intracelular, regulação da transcrição, produção de matriz extracelular, adesão celular e migração. Ainda, entre os 10 genes menos expressos em CAFs, dois estão envolvidos em metabolismo de hormônios esteroides e desintoxicação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, sendo os outros genes envolvidos

em funções de transcrição, migração e sinalização celular. Além disso, fibroblastos mamários imortalizados (HMF) co-cultivados com células de câncer de mama T4-2 ou de epitélio mamário normal S2 (linhagens obtidas de uma mesma paciente) mostrou um agrupamento distinto tanto de NAFs quando de CAFs, indicando que os fatores parácrinos liberados pelas células tumorais em curto período de tempo não são capazes de tornar HMF semelhantes aos CAFs. Entretanto, existem diferenças nas co-culturas de HMF com T4-2 (maligna) versus S2 (normal imortalizada) (Bauer, *et al.* 2010).

Assim, um estudo de nosso grupo também avaliou a interação entre fibroblastos derivados da mama e células epiteliais mamárias. Células MCF10 e MDA-MB-231 foram co-cultivadas em sistemas *transwell* com fibroblastos obtidos de tecidos adjacentes à doença benigna de mama e fibroblastos derivados de carcinoma mamário. O perfil de expressão gênica foi obtido para cada componente do par da co-cultura. Ao contrário às grandes alterações observadas no perfil transcricional das células epiteliais, os fibroblastos foram menos afetados. Entretanto, os genes induzidos por TGF- β 1 e aqueles relacionados a funções de migração tiveram sua expressão reduzida em fibroblastos normais cultivados com células tumorais. Entre os fibroblastos derivados de tecidos tumorais os genes envolvidos em proliferação foram induzidos por ambas as células epiteliais (Rozenchan, *et al.* 2009).

Outro estudo anterior de nosso grupo avaliou a interação entre fibroblastos obtidos do linfonodo comprometido e não comprometido de

pacientes com câncer de mama com linhagens tumorais MDA-MB231, MCF7 e MDA-MB435 observou que cada linhagem exerce uma influência particular sobre a viabilidade e perfil transcricional dos fibroblastos. Além disso, os fibroblastos também exercem influência diferencial sobre a proliferação e perfil transcricional de cada linhagem (Santos, *et al.* 2010).

Ainda, outro estudo de nosso grupo buscou avaliar a expressão gênica de células estromais derivadas da medula óssea comprometida e não comprometida por células tumorais circulantes em pacientes com câncer de mama. Apesar da detecção de citoqueratina 19 por RT-PCR *Nested* confirmar a presença de células tumorais circulantes na medula óssea, não foi observado grandes diferenças entre as células estromais que tiveram ou não contato com células tumorais (Milani, 2006).

Entretanto as diferenças entre células estromais de sítios tumorais primários e sítios metastáticos, como linfonodo e medula óssea, são pouco conhecidas. Assim, nosso objetivo foi comparar o perfil transcricional das células estromais obtidos de vários sítios.

2. Objetivos

Comparar a expressão gênica de fibroblastos do tumor primário (CAF), linfonodos axilares comprometidos (N+) e medula óssea (BMMC) de pacientes com câncer de mama;

3. Justificativa

Estudos anteriores de nosso grupo coletaram amostras de fibroblastos para os projetos de pesquisa da Dr^a Patrícia Bortman, Dr^a Rosângela P. C. Santos e Dr^a Cintia Milani. Foram realizadas análises de expressão gênica das células originadas do tumor primário, do linfonodo e da medula óssea. Porém o perfil transcricional de cada sítio foi avaliado individualmente. O presente trabalho visou reanalisar as informações já obtidas dessas células conjuntamente para observar semelhanças ou diferenças entre as células estudadas.

4. Casuística e Métodos

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados dados de “microarray” obtidos em estudos anteriores de nosso grupo. Dados de células estromais de cultura primária de amostras de câncer de mama foram obtidos para o estudo da Dr^a Patrícia Bortmam, os dados de cultura primária de linfonodo foram obtidos para o estudo da Dr^a Rosângela P. C. Santos e os dados de cultura primária de células estromais de medula óssea foram coletados para o estudo da Dr^a Cintia Milani. Todas as amostras foram provenientes de pacientes com câncer de mama. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 055/11.

4.1. Descrição das Pacientes

Todas as pacientes foram atendidas no Instituto Brasileiro do Controle do Câncer e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido respectivo de cada estudo. As características clínicas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição das pacientes

Amostra	Idade	Estadiamento	Tipo Histológico	Linfonodo	ER	PR	c-ErbB2
* CAF_1	52	II	IDC	-	-	-	+
* CAF_2	44	II	IDC	-	-	+	-
* CAF_3	53	II	ILC	-	-	-	-
* CAF_4	79	II	IDC	-	+	+	-
* N+_1	59	III	ILC	+	-	+	-
* N+_2	41	III	IDC	+	-	+	-
* N+_3	49	III	IDC	+	+	+	+
* BMMC_1	54	I	IDC	-	+	+	+
* BMMC_2	69	I	IDC	-	+	+	-
* BMMC_3	76	III	IDC	+	+	+	-
* BMMC_4	57	II	IDC	+	+	+	-
CAF_5	57	III	IDC	+	+	+	+
CAF_6	63	III	IDC	+	ND	ND	ND
CAF_7	50	I	IDC	-	+	+	-
CAF_8	66	II	IDC	+	+	+	+
CAF_9	57	II	IDC	-	+	+	+
CAF_10	41	II	IDC	-	+	+	+
CAF_11	82	III	IDC	+	-	-	+
N+_4	47	II	IDC	+	+	+	+
N+_5	40	II	IDC	+	+	+	-
N+_6	65	II	IDC	+	-	-	-
N+_7	81	III	IDC	+	+	+	-
N+_8	43	II	ILC	+	ND	ND	ND
BMMC_5	51	III	IDC	+	+	+	-
BMMC_6	63	II	IDC	-	-	-	+
BMMC_7	41	III	IDC	+	+	+	-
BMMC_8	50	II	IDC	-	+	+	-

* Pacientes com expressão gênica avaliada por “microarray”. IDC – carcinoma ductal invasivo; ILC – carcinoma lobular invasivo; ER – expressão de receptor de estrogênio; PR – expressão de receptor de progesterona; c-ErbB2 – expressão de receptor c-ErbB2; ND – não avaliado. CAF – fibroblastos derivados de tumor primário; N+ - fibroblastos derivados de linfonodo; BMMC – fibroblastos derivados da medula óssea.

4.2. Tecnologia do cDNA “microarray”

As amostras de fibroblastos de tumor primário, linfonodo e medula óssea foram hibridizadas em lâminas de cDNA “microarray” 4.8K002 construídas no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, sob a coordenação do Dr. Luiz Fernando Lima Reis. Essas lâminas eram constituídas de 4.800 sequências imobilizadas sendo que 4.608 correspondem a clones de ORESTES (“open reading frame expressed sequence tags”). A plataforma e os dados da lâmina 4.8K002 de cDNA “microarray” foram depositadas no banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO), utilizando-se o formato MIAME, sob o número de acesso GPL 1930 (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo).

A hibridização das lâminas foi realizada no Laboratório de Expressão Gênica do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, sob a coordenação da Dr^a Dirce Maria Carraro. Utilizou-se duplicata das amostras e RNA da célula HB4a como referência. Para o cálculo do valor médio da expressão gênica, foram consideradas as réplicas de duas hibridizações de cada amostra, usando-se a inversão dos corantes Cy3 e Cy5 (“Dye swap”).

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

Foram realizadas análises para determinar a expressão gênica diferencial dos fibroblastos obtidos de mama, linfonodo e medula óssea de pacientes com câncer de mama, antes analisados individualmente, para determinar a expressão gênica de fibroblastos de sítios primários e de sítios metastáticos, como descrito a seguir:

- 1- Fibroblastos de tecido mamário maligno (n= 4)
- 2- Fibroblastos de linfonodo comprometido (n= 3)
- 3- Células estromais de medula óssea (n= 4)

Esses dados foram normalizados conjuntamente, pelo método Lowess, disponível no pacote LIMMA para a plataforma R (realizada no laboratório de Bioinformática e Genômica Medica do Hospital AC. Camargo). Após a normalização, apenas os genes que estiveram presentes em 100% das amostras foram submetidos à análise estatística através do programa TMEV, sendo então aplicado o teste SAM ($FDR < 0,01$) para determinação dos genes diferencialmente expressos. Foi realizada análise de agrupamento hierárquico hereditário utilizando-se a expressão diferencial dos genes, através da distância euclidiana, e o grau de confiança foi testado pela técnica de “bootstrap”.

Para análise funcional, as listas de genes diferencialmente expressos foram submetidas ao programa DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*, v6.7) e os genes representados na lâmina 4.8K002 foram utilizados como “background” a fim de verificar as funções enriquecidas entre os genes.

Para identificar relações entre os genes diferencialmente expressos construímos uma rede de interações utilizando base de dados disponíveis na web. A rede foi construída no laboratório de bioinformática e bioestatística do Centro Internacional de Pesquisa do Hospital A.C. Camargo, em parceria com Leandro A. Lima. Para isso, buscou-se em diversas bases de dados de interação proteína-proteína, como HPRD (“Human Protein Reference Database”), MINT (“The Molecular Interaction Database”) e IntAct (“The IntAct Molecular Interaction Database”), as interações entre as proteínas codificadas pelos genes diferencialmente expressos. Para a construção da rede os genes são representados como nodos, e as interações como arestas. Os genes de entrada são os diferencialmente expressos a partir dos quais são selecionados os demais participantes da rede. Desse modo, foram selecionados apenas os genes que fossem os vizinhos contíguos, isto é, aqueles que possuem interação direta com os genes de entrada, e representados apenas os menores caminhos entre as interações.

A seguir foram identificados os genes “brokers”, isto é, os genes que apresentam um alto número de conexões, mas frequentemente estão conectados a genes sem conexão entre si (Cai, *et al.* 2010). Também foram identificados os genes “bridges”, isto é, genes que podem ou não ser

“brokers”, mas que permitem um alto fluxo de informação e permitem a ligação entre regiões altamente conectadas (Hwang, *et al.* 2008).

4.4. Cultura de células estromais derivadas de tumor primário, linfonodo comprometido e medula óssea de pacientes com câncer de mama

4.4.1. Banco de célula de cultura primária

Realizou-se cultura primária de fibroblastos obtidos de linfonodo axilar e de tumores primários de pacientes com câncer de mama pelo método de explante. As células estromais derivadas de medula óssea foram obtidas pelo método de gradiente de centrifugação pelo reagente Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Inglaterra), onde se obtém a camada de células mononucleares, e quando mantidas em cultura, dentre essas células, apenas as células mesenquimais aderem ao plástico, sendo as outras populações celulares eliminadas pela troca do meio.

Após a terceira passagem observou-se uma cultura homogênea de fibroblastos, verificada pela expressão positiva de vimentina e actina de músculo liso, marcadores específicos para fibroblastos, mas não de citoqueratina, sendo então as células posteriormente congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido.

4.4.2. Cultura primária de fibroblastos

Para obtenção de novas amostras de RNA, foi realizado o descongelamento das culturas primárias armazenadas em nitrogênio líquido. Primeiramente, centrifugou-se a ampola, até então parcialmente descongelada, a 2000 x g por 2 minutos, em seguida aspirou-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensionado para lavagem com 10 mL do meio de cultura propício para cada tipo celular, logo centrifugou-se novamente a 2000 x g por 2 minutos. Após a retirada do sobrenadante, ressuspendeu-se o precipitado (célula) com o meio de cultura e transferiu-se para uma garrafa de cultura com 75 cm² de área (Corning Incorporated, NY, USA), usando um volume de 10 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) para os fibroblastos derivados do tumor primário e linfonodo, para fibroblastos derivados de medula óssea foi utilizado IMEM (Iscove's Modified Eagle Medium) (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA).

Todos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco), 100 µg/mL de ampicilina (Furp, Guarulhos, Brasil), 100 µg/mL de estreptomicina (Furp) e 2,5 µg/mL de anfotericina B (Cristália, São Paulo, Brasil). As células foram mantidas em estufa a 37°C e em atmosfera constante de 5% de CO₂, sendo o meio trocado em um intervalo de aproximadamente cinco dias e tripisinizadas quando necessário para sua expansão e ou congelamento, usando para cada ampola de 2 mL contendo 95% de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco) e 5% de DMSO (Dimetilsulfóxido) (SIGMA, Saint Louis, USA) para um total de 10⁶

células, com viabilidade acima de 95%. Estas ampolas foram estocadas por 24 horas em sistema para congelamento Nalgene™ Cryo (Nalgene Inc, USA) em freezer a -70°C e depois transferidas para um container de nitrogênio líquido, onde permaneceram até o uso.

4.5. Extração de RNA

Quando a cultura de células atingia cerca de 80% de confluência, realizamos a extração de RNA. Para isso, adicionamos 1 mL do reagente TRIzol (Life Technologies, EUA) em uma garrafa de 150 cm², sendo as células lizadas com a ajuda de *cell scraper*. O material lizado é acondicionado em tubos de 1.7 mL e armazenado em freezer -70°C.

Após o descongelamento da amostra, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Nuclear, São Paulo, Brasil) e centrifugado a 12.000 g, 4°C por 15 minutos, tendo a formação de um sistema trifásico, onde o RNA se encontra na fase aquosa (sobrenadante).

Recuperado o sobrenadante, foi acrescentado 500 µL de álcool isopropílico (Nuclear, São Paulo, Brasil), sendo estocada a amostra no freezer -20°C, por um período aproximado de 18 horas. Após esse período de precipitação, a amostra foi centrifugada a 12.000 g, 4°C por 15 minutos, o sobrenadante desprezado e adicionou-se 1 mL de etanol a 75% para lavagem, sendo então a amostra novamente centrifugada a 12.000 g, 4°C por 15 minutos (repete-se 2 lavagens).

Após a secagem do pellet de RNA, este foi ressuspendido em 20 ou 40 μL de água deionizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPEC). Incubou-se por 10 minutos a 65° para permitir completa dissolução do RNA. A concentração de RNA foi determinada por comprimento de onda 260 em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, USA) e para avaliar a qualidade do RNA extraído, todas as amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1% e a integridade do RNA avaliando-se a relação entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S/18S.

4.6. Reação de Transcriptase Reversa (RT) para obtenção de cDNA

A síntese da fita de cDNA foi realizada a partir de 2 μg de RNA total extraído da cultura primária de fibroblastos, ao qual foram acrescentados 200 ng de oligonucleotídeos hexâmeros iniciadores (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Amersham Biosciences, Inglaterra) e 1 μL de dNTP (100 mM) e água ultra pura a completar 14 μL . A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e, posteriormente foi colocada imediatamente no gelo por 2 minutos. Foi adicionado 4 μL de tampão da *SuperScript III* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2) (Invitrogen, EUA), 1 μL de ditioneitol (DTT) a 0,1M (Invitrogen, EUA) e 1 μL da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (200 U/ μL) (Invitrogen, EUA), incubando-se por 60 minutos a 55°C . Ao final eleva-se a temperatura a 70°C por 15 minutos, estocando a -20°C até o uso.

4.7. Desenho dos primers

Os primers foram desenhados a partir da sequência de mRNA descrita no endereço www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide. A sequência do mRNA foi analisada pelo programa Human Blat (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgblat>) e então escolhida a região de interesse para a construção dos primers, ou seja, uma região com presença de grandes íntrons entre éxons de interesse contidos no DNA do gene. Além disso, escolhemos ou a região representada na lâmina de “microarray”, ou o éxon mais próximo. O desenho dos primers e o teste da homologia foram realizados utilizando-se o programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

4.8. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

A reação de PCR partiu de um volume inicial de 13 μL utilizando-se de 1 μL de uma diluição de 1:40 de cDNA e 12 μL de Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As reações aconteceram no termociclador ABI HT 7900 (Applied Biosystems) em 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por um minuto, seguidos da curva de desnaturação. Como gene normalizador, foi utilizado o gene PPIA, descrito em trabalhos anteriores de nosso grupo como um dos genes mais estáveis em amostras de fibroblastos (Benvenuti, 2008).

4.9. Avaliação da expressão dos genes

Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizado o modelo matemático do $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este cálculo avalia a relação entre um gene normalizador, que teoricamente não tem a sua expressão alterada pela condição biológica testada, e o gene alvo a ser analisado. Ainda avalia a mudança dessa proporção (Gene alvo – Gene normalizador) entre a amostra alvo (tratada) e a amostra referência (controle). Este cálculo tem como premissa de que as eficiências dos genes alvo e do gene normalizador devem ser muito próximas de 100% (Livak e Schmittgen, 2001).

4.10. Análise estatística

Os resultados foram apresentados em gráficos de boxplot. Foram utilizados testes não paramétricos para verificar a significância das diferenças. O nível de significância foi bicaudado e $\leq 0,05$. Para as análises, utilizamos o programa estatístico Statistical Package for the Social Sciences, versão 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

5. Resultados

5.1. Perfil de expressão gênica de células estromais de pacientes com câncer de mama

5.1.1. Genes diferencialmente expressos entre os três sítios

Nosso objetivo foi comparar o perfil transcricional de células estromais de órgãos alvo de desenvolvimento tumoral como o sítio primário (CAF), linfonodos axilares (N+) e medula óssea (BMMC). Para isso foi realizado o teste SAM de três classes, $FDR < 0,01$ (mama vs. nodo vs. medula) resultando em 267 genes diferencialmente expressos entre os três grupos (Figura 1a, Anexo Tabela 1). Utilizamos nesta análise somente os genes presentes em 100% das amostras, o que possibilitou a avaliação de 3146 sequências, representando aproximadamente 65% do total de sequências imobilizadas na lâmina, sendo que os genes diferencialmente expressos representam 6% do total de genes investigados.

Esses genes são capazes de agrupar com alta confiabilidade as amostras de acordo com o sítio de origem em três diferentes ramos (Figura 1b). A seguir, utilizando os 267 genes diferencialmente expressos, efetuamos novas análises par a par para identificar as diferenças específicas entre os grupos, através de teste SAM duas classes.

Com o objetivo de obtermos uma visão global das funções enriquecidas pelos genes diferencialmente expressos, utilizamos os 267 genes para avaliação funcional pelo programa DAVID. Utilizando-se como

“background” os genes presentes na lâmina de “microarray” utilizada (4.8k) e aplicando escore EASE (teste exato de Fisher modificado) com valor de $p < 0.1$, observamos o enriquecimento de 37 funções. Dentre as funções enriquecidas, observaram-se principalmente aquelas relacionadas com ligação a íons, spliceossoma, morfogênese e matriz extracelular (Anexo Tabela 3).

Figura 1. A. Agrupamento hierárquico dos 267 genes diferencialmente expressos entre fibroblastos derivados de tumor primário de mama (CAF), linfonodos comprometidos (N+) e células mesenquimais derivadas da medula óssea (BMMC). **B.** Dendrograma do agrupamento hierárquico. Distância euclidiana. O nível de confiabilidade está representado dentro dos quadrados azuis, e os ramos pretos correspondem a 100% de confiabilidade.

5.1.2. Genes diferencialmente expressos entre CAF e N+

Utilizando os 267 genes diferencialmente expressos, comparamos então CAF vs. N+(FDR < 0,01), o que identificou 20 genes que distinguem os fibroblastos derivados desse sítio, sendo oito genes menos expressos em CAF e 12 genes mais expressos. O gene menos expresso em CAF teve uma variação de expressão de 3,95 (CTSC: *cathepsin C* - um coordenador central da ativação de serina proteinases em células inflamatórias e do sistema imune) e o gene mais expresso foi EYA2 (“eyes absent homolog 2” *Drosophila*) com variação de expressão de 5,05 (Anexo Tabela 1).

A avaliação funcional dos genes menos expressos em CAF quando comparados com N+ mostra o enriquecimento de 39 funções. Entre as funções enriquecidas estão aquelas relacionadas ao dano ao DNA, indução e regulação da apoptose e à domínios EGF (Anexo Tabela 4). Entre os genes mais expressos em CAF observou-se o enriquecimento de cinco funções, entre elas as relacionadas à diferenciação celular e a glicosidases (Anexo Tabela 5).

5.1.3 Genes diferencialmente expressos entre CAF e BMNC

Na comparação CAF vs. BMNC foram observados 135 genes menos expressos e 100 genes mais expressos em CAF, quando comparados com

BMMC (Anexo Tabela 1). A diferença de expressão variou de 23 vezes menos expresso para o gene PRICKLE1 (“prickle homolog 1” *Drosophila* – receptor nuclear envolvido na regulação negativa da via de sinalização Wnt/B-catenina) a 22 vezes mais expresso para o gene PLXND1 (plexin D1 – gene envolvido em transição epitélio-mesênquima, angiogênese, e malignidade).

Entre as 34 funções enriquecidas pelos genes menos expressos em CAF quando comparados com BMMC, observamos aquelas relacionadas a ligações a íons metálicos, matriz extracelular, domínios EGF e diferenciação celular (Anexo Tabela 6). Entre os genes mais expressos, as 23 funções enriquecidas foram relacionadas a processos metabólicos de ácidos nucleicos, e biossíntese de macromoléculas (Anexo Tabela 7).

5.1.4. Genes diferencialmente expressos entre N+ e BMMC

Já no grupo N+ vs. BMMC foram observados 141 genes menos expressos e 104 genes mais expressos em N+ (Anexo Tabela 1). A variação da diferença da expressão foi de 25,4 vezes menos expresso para o gene CD59 (“CD59 molecule, complement regulatory protein” - glicoproteína de superfície celular que regula a lise celular mediada por complemento, além disso, está envolvida na transdução de sinal em linfócitos e ativação de células T) e até 30 vezes mais expresso para o gene PLXND1 (que também foi o gene mais expresso em CAF vs. BMMC).

Entre as 25 funções enriquecidas pelos genes menos expressos em N+ versus BMMC encontram-se aquelas relacionadas à ligação de íons metálicos, formação de mesoderme e proteínas de membrana (Anexo Tabela 8). Dentre os genes mais expressos em N+ observamos o enriquecimento de 20 funções, sendo elas relacionadas às proteínas com domínios de dedos de zinco e apoptose (Anexo Tabela 9).

A seguir verificamos se existe intersecção entre os genes diferencialmente expressos ao compararmos CAF vs. BMMC e N+ vs. BMMC. Para isso, analisamos separadamente os genes mais expressos em BMMC (quando comparados com CAF e N+) (Figura 2A) e os genes menos expressos em BMMC (Figura 2B).

Figura 2. Diagrama de Venn agrupando os genes diferencialmente expressos de acordo com sua origem. Em cinza genes cuja expressão aponta para uma mesma direção. **A.** Genes menos expressos em CAF e N+ quando comparados com BMMC. **B.** Genes mais expressos em CAF e N+ quando comparados com BMMC.

5.2. Genes diferencialmente expressos entre comparações por fatores clínicos

Realizamos também uma análise exploratória dos dados clínicos das pacientes na tentativa de avaliar as diferenças entre fibroblastos de pacientes com câncer de mama em relação a algumas características clínicas. Para esta avaliação agrupamos os fibroblastos, independente de sua origem, isto é, tumor primário, linfonodo ou medula óssea de acordo com a idade (maior ou menor de 50 anos), estadiamento clínico (I e II contra III), presença de linfonodos comprometidos e status do receptor c-ErbB2 (Anexo Tabela 2).

Comparando pacientes de acordo com a idade, menores ou maiores de 50 anos, observamos que fibroblastos de pacientes mais jovens (menores de 50 anos) apresentaram maior expressão de sete genes, em relação a pacientes maiores de 50 anos, com a diferença de expressão variando de 1,7 vezes para o gene FUBP3 (“far upstream element {FUSE} binding protein 3”) a 3,8 vezes para o gene AKAP12 (“A kinase {PRKA} anchor protein 12”) (Anexo Tabela 2).

Em relação ao estadiamento clínico, observamos que fibroblastos de pacientes com estadiamento precoce (I e II) possuem três genes mais expressos, quando comparados com estadiamento III, com a diferença de expressão variando de 4,0 vezes para o gene ACTN4 (“actinin, alpha 4”) e 2,5 vezes para o gene NRN1 (“neuritin 1”) (Anexo Tabela 2).

A comparação que leva em consideração o status linfonodal resultou em cinco genes mais expressos em pacientes que ao tempo da coleta dos dados não apresentaram metástase linfonodal. A variação da expressão foi de 1,81 vezes para o gene BLCAP (“bladder cancer associated protein”) a 2,32 vezes para o gene NRN1 (Anexo Tabela 2).

O status do receptor c-ErbB2 mostrou que dois genes estavam mais expressos em fibroblastos de pacientes com câncer de mama positivo para c-ErbB2, sendo 1,58 vezes para SLC29A1 (“solute carrier family 29 {nucleoside transportes}, member 1”) e 1,93 vezes para TTLL1 (“tubulin tyrosine ligase-like family, member 1”) (Anexo Tabela 2).

Entretanto, nenhum dos genes identificados nas comparações por fatores clínicos foi observado como diferencialmente expresso nas comparações por sítio de origem.

5.3. Agrupamento de funções e seleção de genes candidatos

Anotações funcionais podem ser redundantes, pois o mesmo gene pode levar ao enriquecimento de diversas funções ou muitas das funções enriquecidas podem ser semelhantes. Assim decidimos, também, avaliar o agrupamento das funções, levando em consideração que anotações funcionais semelhantes possuem genes semelhantes. Os grupos de anotações são ranqueados pela média geométrica dos *p*-valores das

funções pertencentes ao grupo, assim as funções com o maior escore são aquelas que apresentam a maior consistência entre os p -valores (DAVID).

Desse modo, entre os 267 genes foram encontrados cinco grupos de funções enriquecidas, cujos p -valores são menores que 0,1. Estes grupos correspondem a funções relacionadas à ligação a íons, spliceossoma, morfogênese tecidual, regiões de dedos de zinco e matriz extracelular (Anexo Tabela 10).

Como funções relacionadas à morfogênese e desenvolvimento estão enriquecidas nas diversas comparações entre os fibroblastos, decidimos ampliar os critérios para incluir genes que estão envolvidos em funções similares de diferenciação.

Para isso, realizamos uma nova avaliação dos grupos de funções entre os 267 genes diferencialmente expressos, agora com critérios de média estringência (de acordo com critérios pré-definidos pelo programa), resultando em 101 grupos de funções. Foram selecionados 31 genes, que agrupam com alta confiabilidade os fibroblastos de acordo com sua origem, os quais estavam presentes em 10 grupos de funções que tinham alguma relação com morfogênese e diferenciação. Entre estes genes, sete são diferencialmente expressos entre células derivadas da mama e linfonodo, 29 entre células derivadas da mama e medula óssea e 25 entre células derivadas do linfonodo e medula óssea. (Figura 3).

Utilizando os 31 genes relacionados a diferenciação, construímos uma rede de interação proteína-proteína. Esta rede é composta por 484 nodos e 2573 arestas, sendo que todos os 31 testados estão conectados.

Como esta rede de interação apresenta alta complexidade, decidimos selecionar os 5% dos genes com maior escore para “brokers”, isto é, os genes com alto número de conexões, resultando em 25 genes, destacando-se com os maiores índices GRB2 (“growth factor receptor-bound protein 2”), SYK (“spleen tyrosine kinase”) e EGFR (“epidermal growth factor receptor”) (Anexo Figurar 1). Selecionamos também os 5% dos genes com maior escore para “bridges”, resultando em 25 genes, destacando-se com os maiores índices DTNBP1 (“dystrobrevin binding protein 1”), CCL5 (“chemokine {C-C motif} ligand 5”) e CCL20 (“chemokine {C-C motif} ligand 20”) (Anexo Figura 2).

Além dos “brokers” e dos “brigdes”, setecionamos também os 31 genes envolvidos em diferenciação, o que resultou em uma rede com 75 nodos e 170 arestas, mostrando que dentre os genes diferencialmente expressos, os genes FGFR1 (“fibroblast growth factor receptor 1”), MYH9 (“myosin, heavy chain 9, non-muscle”), SYK e MTOR (“mechanistic target of rapamycin {serine/threonine kinase}”) estão entre os melhores “brokers” (Figura 4).

Após estas análises, foram escolhidos como candidatos para validação, os genes ADCY2 (“adenylate cyclase 2 {brain}”), ANTXR1 (“anthrax toxin receptor 1”), CYR61 (“cysteine-rich, angiogenic inducer, 61”),

DNAH1 (“dynein, axonemal, heavy chain 1”), DUSP1 (“dual specificity phosphatase 1”), FGFR1, HECTD1 (“HECT domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1”), HNMT (“histamine N-methyltransferase”), KLF5 (“Kruppel-like factor 5 (intestinal)”), LOX (“lysyl oxidase”), MACF1 (“microtubule-actin crosslinking factor 1”), MYH9, NOTCH2 (“notch 2”), SLC1A3 (“solute carrier family 1 {glial high affinity glutamate transporter}, member 3”), TACC1 (“transforming, acidic coiled-coil containing protein 1”), TXNRD1 (“thioredoxin reductase 1”) e USP16 (“ubiquitin specific peptidase 16”), por estarem envolvidos na diferenciação celular ou possuírem valor de diferença de expressão maior que dois e serem comumente modulados em sítios de contato com células tumorais (mama e linfonodo).

Figura 3. Agrupamento hierárquico entre os genes envolvidos em morfogênese, embriogênese, desenvolvimento e diferencialmente expressos entre fibroblastos derivados de câncer de mama (CAF), linfonodos comprometidos (N+) e células mesenquimais derivadas da medula óssea (BMNC).

Fig. 4

The diagram illustrates a complex network of gene interactions. Nodes are represented by circles (pink for transcription factors, grey for others) and diamonds (blue for transcription factors, grey for others). The network is highly interconnected, with a central cluster of transcription factors and various peripheral nodes. The diagram illustrates the regulatory network of the 10 transcription factors listed in the caption.

5.4. RT-qPCR

Para obtenção de material para análise da expressão dos genes candidatos, algumas das células obtidas nos estudos anteriores foram novamente submetidas à cultura. Ao atingir confluência adequada (cerca de 80%) foi extraído o RNA e realizada a análise da expressão dos genes selecionados.

Desse novo grupo de amostras, seis casos eram comuns aos analisados pelo “microarray”. Isso nos permitiu avaliar se existe a correlação (de Pearson) entre os dados do “microarray” com RT-qPCR. Dos genes testados, os genes ADCY2, DNAH1, MYH9, NOTCH2, SLC1A3 apresentaram correlação positiva (Anexo Tabela 11).

Como validação biológica, os genes que apresentaram correlação positiva foram selecionados para serem testados em um novo grupo amostral, sendo sete casos de fibroblastos derivados de tumor de mama, quatro fibroblastos derivados de linfonodo comprometido, e quatro amostras de medula.

Nesta situação a comparação entre CAF e BMMC confirmou que os genes ADCY2 e SLC1A3 estão significativamente mais expressos em BMMC (**Figura 5**) que existe uma tendência de ADCY2 estar mais expresso em BMMC quando comparado com N+ (**Figura 6**); e que NOTCH2 e SLC1A3 estão significativamente mais expressos em N+ em relação à CAF (**Figura 7**).

Como encontramos concordância entre os dados do “microarray” com o RT-qPCR para as comparações entre CAF e BMMC, mas por outro lado baixa concordância entre as diferentes metodologias nas comparações com fibroblastos derivados de linfonodo, decidimos analisar a expressão de outros genes na comparação CAF vs. BMMC em um novo grupo amostral o qual foi submetido ao recultivo. Assim, os genes HECTD1, HNMT, LOX, MACF1 e USP16 foram significativamente mais expressos em BMMC e a maioria dos genes estudados apresentou a mesma tendência entre os dados do RT-qPCR e do “microarray” (**Figura 8**).

Figura 5. Expressão gênica em CAF vs. BMMC (validação biológica). Comparação entre valores obtidos para expressão gênica por “microarray” (intensidade de sinal) e RT-qPCR (expressão relativa) para CAF e BMMC. Eixo y representa valores em log2. Como referência para RT-qPCR foi utilizada a média dos CTs (para o mesmo transcrito) de todas as amostras. CAF: fibroblastos de tumor primário (Array n=4; RT-qPCR n = 6 a 7); BMMC: células estromais da medula óssea (Array n=4; RT-qPCR n =3 a 4); Asterisco representa comparação que atingiu nível de significância, teste de Mann-Whitney com $p \leq 0,05$. Todas as comparações entre os dados do “microarray” atingiram significância (teste SAM, FDR < 0,01). Box plot mostra a distribuição de todos os valores entre as barras (25º, 50º, 75º quartis estão dentro do box).

Figura 6. Expressão gênica em N+ vs. BMMC (validação biológica). Comparação entre valores obtidos para expressão gênica por “microarray” (intensidade de sinal) e RT-qPCR (expressão relativa) para CAF e BMMC. Eixo y representa valores em log2. Como referência para RT-qPCR foi utilizada a média dos CTs (para o mesmo transcrito) de todas as amostras. N+: fibroblastos de linfonodo comprometido (Array n=3; RT-qPCR n = 3 a 4); BMMC: células estromais da medula óssea (Array n=4; RT-qPCR n =3 a 4); Todas as comparações entre os dados do “microarray” atingiram significância (teste SAM, FDR < 0,01), exceto para o gene NOTCH2. Box plot mostra a distribuição de todos os valores entre as barras (25º, 50º, 75º quartis estão dentro do box).

Figura 7. Expressão gênica em CAF vs. N+ (validação biológica). Comparação entre valores obtidos para expressão gênica por “microarray” (intensidade de sinal) e RT-qPCR (expressão relativa) para CAF e BMMC. Eixo y representa valores em log2. Como referência para RT-qPCR foi utilizada a média dos CTs (para o mesmo transcrito) de todas as amostras. CAF: fibroblastos de tumor primário (Array n=4; RT-qPCR n = 6 a 7); N+; fibroblastos de linfonodo comprometido (Array n=3; RT-qPCR n = 3 a 4). Asterisco representa comparação que atingiu nível de significância, “microarray”: teste SAM, FDR < 0,01; RT-qPCR: teste de Mann-Whitney com $p \leq 0,05$. Box plot mostra a distribuição de todos os valores entre as barras (25º, 50º, 75º quartis estão dentro do box).

Figura 8. Comparação CAF vs. BMMC. Comparação entre valores obtidos para expressão gênica por “microarray” (intensidade de sinal) e RT-qPCR (expressão relativa) para CAF e BMMC. Eixo y representa valores em log2. Como referência para RT-qPCR foi utilizada a média dos CTs (para o mesmo transcrito) de todas as amostras. CAF: fibroblastos de tumor primário (Array n=4; RT-qPCR n =3); BMMC: células estromais da medula óssea (Array n=4; RT-qPCR n =3); Asterisco representa comparação que atingiu nível de significância, teste de Mann-Whitney com $p = 0,05$. Todas as comparações entre os dados do “microarray” atingiram significância (teste SAM, $FDR < 0,01$). Box plot mostra a distribuição de todos os valores entre as barras (25º, 50º, 75º quartis estão dentro do box).

6. Discussão

6.1. Perfil de expressão gênica de células estromais de diferentes origens

6.1.1. Genes diferencialmente expressos entre fibroblastos

O câncer de mama pode originar metástase linfonodal e a distância, e como previsto por Paget, as células tumorais se comportam como sementes que necessitam de um solo adequado para germinar (microambiente do sítio potencialmente metastático) (Steeg, 2006; Joyce e Pollard, 2009;). Dentre as células que se destacam no microambiente, estão os fibroblastos, que poderiam influenciar a instalação e desenvolvimento do câncer (Kalluri e Zeisberg, 2006).

De acordo com essa hipótese, um estudo prévio do nosso grupo identificou que os fibroblastos de linfonodo podem influenciar a proliferação e migração de células de câncer de mama (Santos, *et al.* 2011). Assim, o presente trabalho teve por objetivo comparar o perfil transcricional diferencial de fibroblastos originários de potenciais sítios tumorais em pacientes com câncer de mama.

Desso modo, foram identificados 267 genes diferencialmente expressos entre os sítios estudados, os quais apropriadamente agruparam os fibroblastos de acordo com sua origem, indicando que fibroblastos de diferentes sítios possuem comportamentos distintos.

Como os tecidos da mama, linfonodo e medula óssea são diferentes em sua composição e função, é possível que o sítio de origem module o perfil transcricional dos fibroblastos. Por outro lado, os fibroblastos estudados são oriundos de cultura primária, o que reduziria a influência do microambiente ao qual eles pertenciam. Contudo, devido às diferenças observadas, é possível que a programação epigenética que caracterizaria a origem de cada célula tenha se mantido, mesmo que essas células tenham perdido a influência do ambiente de origem.

Não é a primeira vez que são descritas diferenças no perfil transcricional entre fibroblastos de diferentes origens. Um estudo comparando o perfil de expressão gênica de cultura primária de fibroblastos de 10 sítios (preferencialmente pele, porém de diversos sítios anatômicos) mostrou que fibroblastos de cada sítio apresentam um perfil transcricional distinto, sugerindo que, dependendo da localização, os fibroblastos poderiam ser considerados células distintas (Chang, *et al.* 2002). Entretanto as células estudadas eram de pacientes normais, sem relação com alguma doença.

Outro estudo relacionando a organização espacial e a expressão gênica global de 47 populações de culturas primárias de fibroblastos humanos, representando 43 sítios anatômicos diferentes, também preferencialmente pele, apontou que fibroblastos possuem um perfil transcricional distinto de acordo com a sua origem anatômica. Além disso, identificou uma assinatura que demarcaria uma relação proximal distal nos membros, uma segunda assinatura relacionada à metade anterior ou posterior do corpo, e uma terceira assinatura que diferenciaria a origem

dermal e não dermal dos fibroblastos. Desse modo, uma assinatura composta por 337 genes agrupou os fibroblastos de acordo com a sua origem (Rinn, *et al.* 2006), e entre os quais se incluem os genes EIF2AK4, LOX e SLC1A3, também observados como diferencialmente expressos entre fibroblastos de câncer de mama, metástase linfonodal e medula óssea em nosso estudo.

Esses dois estudos também ressaltam a importância dos genes pertencentes à família HOX de fatores de transcrição como envolvidos no desenvolvimento e responsáveis pela demarcação posicional dos fibroblastos. Da mesma forma, os nossos dados mostram que o gene HOXB9 (homeobox B9 – fator de transcrição envolvido em proliferação e diferenciação) é diferencialmente expresso entre fibroblastos derivados da mama e linfonodo contra medula óssea. Portanto, o perfil transcricional de fibroblastos sugere refletir a origem dos mesmos.

Avaliamos também as funções enriquecidas pelos 267 genes diferencialmente expressos entre os três sítios, sendo a mais enriquecida aquela que agrupa as proteínas que possuem ligação a íons, entre eles cálcio e zinco. Entretanto esses genes pertencem a diversas famílias e representam diversos processos biológicos.

6.1.2. Genes diferencialmente expressos entre CAF e N+

As diferenças entre os fibroblastos derivados de tumor primário e aqueles derivados da metástase linfonodal são representadas por apenas 20 dos 267 genes diferencialmente expressos entre os três sítios. Dentre os genes mais expressos em N+, encontramos NOTCH2, ERCC6 (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6) e NELL1 (NEL-like 1 (chicken)), os quais foram responsáveis pelo enriquecimento de funções como dano ao DNA e morte celular. Entre os genes mais expressos em CAF, identificamos EYA2 (eyes absent homolog 2) e SOX9 (SRY sex determining region Y) os quais enriqueceram funções de diferenciação, e GALC (galactosylceramidase) e FUCA1 (fucosidase, alpha-L- 1, tissue) os quais são glicosidases.

Também obtivemos a confirmação por RT-qPCR de uma maior expressão de NOTCH2 e SLC1A3 em N+. O gene NOTCH2 codifica uma proteína transmembrana que apresenta um domínio extracelular composto por repetições múltiplas parecidas com fator de crescimento epidermal. Já o gene SLC1A3 é um membro da família dos transportadores com alta afinidade para glutamato. Ambos os genes podem ter papel na diferenciação (Maragakis, *et al.* 2004)

Uma hipótese para explicar a semelhança entre os fibroblastos do sítio primário e da metástase regional, é que no processo de invasão células estromais podem migrar conjuntamente com células tumorais para os sítios metastáticos, favorecendo a formação de um nicho adequado para a

instalação da metástase (Friedl, *et al.* 2012; O'Connell, *et al.* 2011). Assim, a semelhança no perfil transcricional entre os fibroblastos derivados do tumor primário e da metástase linfonodal pode ser indicativo da migração de células estromais do sítio primário.

Por outro lado, como os fibroblastos derivados da mama e linfonodo foram obtidos de sítios onde havia a instalação de uma população de células malignas e ainda, representam sítios anatomicamente próximos, é possível que as células tumorais modulem o microambiente nos dois sítios de uma maneira semelhante.

Já foi observado que a metástase apresenta semelhanças com o tumor primário. Um estudo avaliando a expressão de Ciclina B1, MMP1, ICAM-1, RARb, Ki67, ER, PgR, p53, bcl-2 e c-erbB2 por imunohistoquímica mostrou que existe uma grande correlação de expressão entre o tumor primário e a metástase linfonodal (D'Andrea, *et al.* 2007). Seguindo o mesmo raciocínio, é esperado que as células tumorais modulem o compartimento estromal da metástase também de maneira semelhante ao tumor primário.

De acordo com essa teoria, estudos anteriores do nosso grupo identificaram que células de câncer de mama podem influenciar o perfil transcricional de fibroblastos tanto de tumor primário quanto de linfonodos, quando em co-cultura por *transwell*, que permite apenas a passagem de fatores solúveis (Rozenchan, *et al.* 2009; Santos, *et al.* 2011). Outro estudo ainda ressaltou que passagens iniciais de cultura de miofibroblastos estromais associados a câncer gástrico possuem um perfil hipometilado do DNA genômico, quando comparados com células estromais normais

adjacentes ao tumor (Jiang, et al. 2008), portanto o contato ou a proximidade com o tumor primário pode influenciar o perfil de expressão gênica dos fibroblastos.

6.1.3. Genes diferencialmente expressos em BMMC

Assumindo como referência as células estromais derivadas da medula, observamos 235 genes diferencialmente expressos na comparação com as células derivadas do tumor primário e 245 para a comparação com as células derivadas do linfonodo. Essas comparações incluem todos os 267 genes diferencialmente expressos, indicando novamente que fibroblastos derivados de sítios com a presença de células tumorais (tumor primário e metástase linfonodal) possuem um perfil transcricional semelhante e, consequentemente, igualmente distintos da medula óssea.

Entre os genes mais expressos em BMMC, podemos destacar ADCY2, na comparação CAF vs. BMMC e N+ vs. BMMC, e SLC1A3 na comparação CAF vs. BMMC, resultado este confirmado em novo grupo de amostras analisados por RT-qPCR. Ambos os genes citados acima codificam proteínas associadas à membrana, sendo que ADCY2 (mais expresso em BMMC) catalisa a formação de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e pode estar relacionado a proliferação e mau prognóstico do câncer colorretal (Yu, et al. 2011) e SLC1A3 (menos expresso em CAF) é um transportador de membrana associado a glutamato. Esses genes podem ter papel na mediação da sinalização do meio externo para o meio intracelular.

Como encontramos concordância entre os dados do “microarray” com o RT-qPCR para as comparações entre CAF e BMMC, mas por outro lado baixa concordância entre as diferentes metodologias na comparação com fibroblastos derivados de linfonodo, decidimos prosseguir na análise de expressão de outros genes na comparação CAF vs. BMMC apenas nas amostras submetidas ao recultivo.

Neste caso, também podemos destacar a maior expressão de HECTD1, HNMT, LOX, MACF1 e USP16 em BMMC, pois os resultados em amostras avaliados por “microarray” também foram reproduzidos em outra casuística em ensaios de RT-qPCR.

Além disso, a maioria dos genes estudados na comparação CAF vs. BMMC (ANTXR1, CYR61, DUSP1, FGFR1, KLF5, MYH9, NOTCH2 e TACC1) apresentaram tendência a maior expressão em células estromais derivadas da medula óssea, em ensaios de RT-qPCR, confirmando dados inicialmente observados por “microarray”, sendo quase todos os genes envolvidos em diferenciação, exceto DNAH1 e DUSP1.

Os genes, HNMT e USP16 podem ter envolvimento em proliferação, já que a histamina pode ter uma ação proliferativa em linhagens de câncer de cólon (Kuefner, *et al.* 2008) e uma forma mutante de USP16 bloqueou a divisão celular (Cai, *et al.* 1999). Porém, em relação a esta função, é difícil prever a influência destes genes, pois enquanto alguns atuam favorecendo a proliferação, como CYR61, FGFR1 e TACC1 (Jay, *et al.* 1997; Ornitz, *et al.* 1996; Peset e Vernos, 2008), outros podem ser reguladores negativos da

proliferação, como DUSP1 e NOTCH2 (Cook, et al. 2010; Sriuranpong, *et al.* 2001).

Alguns genes possuem interação com proteínas do citoesqueleto, como ANTXR1, MACF1, MYH9 e TACC1 (Werner, et al. 2006; Wet al. 2008; Wei e Adelstein, 2000; Barbe, *et al.* 2008), enquanto outros possuem interação com proteínas da matriz extracelular, como CYR61 e LOX (Xiao e Ge, 2012). Além disso, alguns genes estão envolvidos em migração, como ANTXR1, CYR1, DNAH1, MACF1 e MYH9 (Gutwein, *et al.* 2011; Nguyen, et al. 2006; Vaughan, et al. 1996; Wu, et al. 2008; Bao, *et al.* 2005).

Alguns genes podem também ter participar da sinalização celular, participando da sinalização extracelular, como CYR61, ou atuando como receptores de membrana, como ANTXR1, FGFR1, NOTCH2 ou participando da regulação de mediadores secundários, como ADCY2 e DUSP1. Dentro desse contexto o gene KLF5 atua como fator de transcrição e o gene TACC1 pode atuar como proteína scaffold, modulando a atividade transcricional de receptores hormonais nucleares (Guyot, *et al.* 2010).

Além disso, alguns genes também possuem uma relação com angiogênese e formação de vasos, como CYR61 que atua sobre receptores de células endoteliais, estimulando sua migração e proliferação (Chen e Du, 2007) e FGFR1 e KLF5 podem induzir a expressão de diversos fatores pró-angiogênicos (Magnusson, *et al.* 2007; Nagai, *et al.* 2005). Com expressão induzida por hipóxia, LOX pode promover o remodelamento de matriz

necessário à formação de novos vasos (Allen e Jones, 2011; Weis e Cheresh, 2011).

Entre as funções desempenhadas por alguns genes encontram-se também modificações pós traducionais, como ubiquitinação pelos genes HECTD1 e USP16 (Sarkar e Zohn, 2012; Joo, *et al.* 2007), metilação pelo gene HNMT (Kuefner, *et al.* 2008) e formação de ligações covalentes cruzadas pelos genes LOX e MACF1 (Xiao e Ge, 2012; Wu, *et al.* 2008). Já o gene TXNRD1 tem papel na regulação do estado redox celular e pode possuir papel prognóstico no câncer de mama (Cadenas, *et al.* 2010).

Apesar de haver algumas amostras em que foi observada a presença de micrometástase (Milani, 2006), as células estromais obtidas da medula óssea apresentam um perfil transcricional muito semelhante em relação à presença ou não de células tumorais ocultas. Estas observações indicam que entre as três origens, a medula óssea ou exerce a maior influência no perfil transcricional de seu estroma e que se mantêm após cultivo celular, ou as células estromais que compõem a medula óssea possuem um programa transcricional intrinsecamente distinto.

Assim, quando observamos as funções enriquecidas pelos genes mais expressos em células estromais da medula, observamos diversas funções relacionadas à diferenciação e morfogênese.

Os 31 genes que levam ao enriquecimento de funções de diferenciação agrupam separadamente os fibroblastos de acordo com sua origem, e participam de uma rede de interações com importantes proteínas reguladoras do ciclo celular e sinalização intracelular, como p53, Brca1, Myc,

Mtor/Akt1, beta catenina, Pik3r1, Egfr e Grb2. Entretanto, a maioria dos genes diferencialmente expressos aparece na periferia da rede de interações, indicando que a regulação dessa função é complexa, envolvendo vários níveis de conectividade.

Além disso, os genes diferencialmente expressos formam uma rede onde os três genes *broker* mais importantes são receptores tirosina kinase, como SYK (também presente entre os genes diferencialmente expressos) e EGFR ou são mediadores da sinalização de receptores de fatores de crescimento, como GRB2. Os três genes “bridges” mais importantes dessa rede, porém não presentes entre os genes diferencialmente expressos, são duas quimiocinas, como CCL20 e CCL5 e uma proteína envolvida na síntese do melanossomo, o DTNBP1. Assim, apesar de não diferencialmente expressos, esses genes podem indicar uma atividade diferencial nesse contexto. Por outro lado, os genes FGFR1, MYH9, SYK e MTOR, diferencialmente expressos entre CAF e BMMC, também se encontram entre os 5% dos genes com maior índice para *broker* o que pode sugerir um importante papel regulador desses genes.

Fibroblastos e células tronco mesenquimais são semelhantes entre si, pois possuem características comuns como aderência ao plástico, morfologia fusiforme, capacidade de diferenciação para osso, tecido adiposo, cartilagem, compartilham um potencial imunomodulatório e ambas as células expressam marcadores como CD73 e CD105 (origem mesenquimal) (Haniffa, *et al.* 2009).

Entretanto, apesar das semelhanças, estudos relatam que células estromais derivadas da medula óssea possuem características menos diferenciadas e potencial para diferenciação em outros tecidos. Assim, foi observado que células estromais de medula óssea de camundongos (obtidas pela capacidade de populações celulares mononucleares derivadas da medula óssea aderir ao plástico) apresentavam características semelhantes a fibroblastos derivados de embriões de camundongo no que diz respeito à diferenciação *ex vivo* para osteoblastos, adipócitos e condrócitos, além da semelhança no perfil de marcadores de superfícies (Saeed, *et al.* 2011).

Ainda, os grupos de genes envolvidos em diferenciação podem se enquadrar em algumas hipóteses para a origem do estroma tumoral, sugerindo que o microambiente pode ser composto por uma diversidade de células agrupadas como fibroblastos associados ao tumor.

A primeira hipótese sugere que fibroblastos associados ao tumor são originados do próprio tecido, pois quando em contato com o câncer se tornam ativados, sendo então chamados também de miofibroblastos (Kalluri e Zeisberg, 2006). Assim, fibroblastos de diferentes sítios seriam derivados ainda no desenvolvimento embrionário (Chang, *et al.* 2002; Rinn, *et al.* 2006). E por isso apresentaram diferenças entre os genes envolvidos em diferenciação e morfogênese.

Outra hipótese é que os fibroblastos que compõem o tumor seriam derivados da transição epitélio mesênquima (Radisky, *et al.* 2007), onde

células tumorais epiteliais se apropriam dos mecanismos embrionários de gastrulação, formação de mesoderme e formação do tubo neural e adquirem características mesenquimais (Micalizzi, *et al.* 2010). Dentro desse contexto, observaram-se funções como desenvolvimento de mesoderme, gastrulação e desenvolvimento de neurônios entre os genes diferencialmente expressos. Ainda, como os fibroblastos obtidos da mama e linfonodo eram derivados de massas tumorais e os da medula não, as células estromais derivadas desses sítios podem diferir devido à transição epitélio mesênquima.

Uma terceira hipótese é que células tronco mesenquimais migrem seletivamente para o tumor onde se diferenciam para miofibroblastos, compondo assim uma das populações dos fibroblastos associados ao câncer (Hanahan e Weinberg, 2011; Karnoub, *et al.* 2007; Quante, *et al.* 2011; Kidd, *et al.* 2012). Assim, o gene FGFR1 apresentou-se menos expresso em fibroblastos derivados da mama e linfonodo quando comparado com aqueles derivados da medula óssea. Estudos também mostraram que a perda da expressão de FGFR1 é importante para ativar o processo de diferenciação de células tronco mesenquimais, e que a expressão de FGFR1 é necessária para manter as células células tronco mesenquimais em estado indiferenciado (Lai, *et al.* 2011; Hellingman, *et al.* 2010).

Deste modo, acredita-se que os genes diferencialmente expressos e envolvidos em diferenciação, tais como, ANTXR1, CYR61, FGFR1, HECTD1, KLF5, LOX, MACF1, MYH9, SLC1A3 e TXNRD1 podem indicar que, apesar dos fibroblastos terem origem mesenquimal e apresentarem os mesmos marcadores, como expressão de vimentina e alfa actina de musculo

liso e ausência de expressão de citoqueratinas, estas células podem ter sido derivadas de processos de diferenciação distintos.

6.2. Expressão gênica por características clínicas

Apesar de fibroblastos de diferentes origens possuírem um perfil transcricional distinto, decidimos explorar se, independentemente da origem, existiriam genes diferencialmente expressos de acordo com algumas características clínicas das pacientes, como idade (maior vs. menor de 50 anos), estadiamento clínico (I e II vs. III), comprometimento linfonodal e expressão de c-ErbB2.

Ao comparar pacientes mais jovens contra as maiores de 50 anos observamos sete genes diferencialmente mais expressos em pacientes jovens, os quais podem influenciar o desenvolvimento e comportamento tumoral. Alguns estão envolvidos com c-myc, como FUBP3 e IOP7 (Weber, *et al.* 2008; Golomb, *et al.* 2012) e sinalização celular, como ITGB3 (Langsenlehner, *et al.* 2006). Outros podem suprimir a ação de p53 via MDM2, como NOLC1 (Hwang, *et al.* 2009), reduzir a proliferação, como EMP-1 (Wang, *et al.* 2003), inibir a transcrição, como ZNF295 (Wang, *et al.* 2005) e até agir como supressor tumoral, como AKAP12 (Yoon, *et al.* 2007).

Um estudo observou que podem ser identificadas diferenças transcricionais associadas à idade dos fibroblastos. Foi avaliando o perfil de expressão gênica de cultura de fibroblastos dérmicos de pacientes idosos (idade média 90 anos) contra pacientes jovens (idade média de 23 anos)

sendo então identificado um perfil de 104 genes diferencialmente expressos. Entre as funções enriquecidas são observados metabolismo de carboidratos, sinalização de Wnt/B-catenina, citoesqueleto, ciclo celular, processamento de RNA e função mitocondrial. Ainda, a análise por GSEA indicou o enriquecimento de funções como exportação nuclear, complexo de poro, spliceosoma e fuso entre as mais expressas em pacientes jovens (Dekker, *et al.* 2012).

Já a comparação levando em consideração o comprometimento linfonodal resultou em cinco genes mais expressos em fibroblastos de pacientes que não apresentaram metástase linfonodal no ato da cirurgia, incluindo dois desses genes (NRN1 e DCUN1D4) também mais expressos em estadiamento iniciais (I e II), quando comparados a estadiamento tardio (III).

O Gene NRN1 é expresso em neurônios em diferenciação pós-mitótica durante o desenvolvimento do sistema nervoso e em estruturas neuronais associadas à plasticidade no adulto. Estudos observaram hipermetilação em sua região promotora em amostras de tecido de câncer de mama (Kim, *et al.* 2011). O gene DCUN1D4 está relacionado ao processo de neddilação, o qual conjuga uma proteína semelhante à ubiquitina (Nedd8) às proteínas alvo (Kurz, *et al.* 2005). O processo de neddilação pode provocar mudanças conformacionais, inibir interações ou fornecer uma nova superfície de ligação nas proteínas alvo (Rabut e Peter, 2008).

Como esses genes foram identificados pela comparação de pacientes em estágios iniciais da doença com aqueles em estágios mais avançados, é

possível que o tumor primário exerça influência em sítios à distância, ou que existam diferenças intrínsecas nos fibroblastos de pacientes com câncer de mama menos agressivo em comparação àqueles mais agressivos.

A comparação de acordo com a expressão de c-ErbB2 resultou em 2 genes mais expressos (SLC29A1, envolvida no transporte de nucleotídeos e TTLL1 – envolvido na ligação de tirosina à tubulina) em pacientes com tumores positivos para este receptor. Não foi possível comparar os dados das pacientes de acordo com o status do receptor hormonal, pois apenas duas possuíam receptor hormonal negativo. Entretanto é possível que diferentes subtipos moleculares do câncer de mama modulem de maneira diferencial seu microambiente.

Apesar de identificados genes diferencialmente expressos quando os fibroblastos foram agrupados de acordo com algumas características clínicas, essas diferenças não se sobrepõem àquelas identificadas quando os fibroblastos são agrupados de acordo com os sítios de origem.

7. Conclusão

Os dados do presente estudo indicam que cultura primária de fibroblastos de pacientes com câncer de mama obtidos do tumor primário, metástase linfonodal e medula óssea podem apresentar perfis de expressão gênica distintos. As maiores diferenças foram observadas em fibroblastos derivados da medula óssea, quando comparados com aqueles derivados do tumor primário e linfonodo, o que pode indicar uma possível influência prévia das células tumorais nesses últimos dois sítios.

8. Anexos

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos entre fibroblastos derivados de câncer de mama (CAF), fibroblastos derivados de linfonodos comprometidos (N+) e células estromais derivadas da medula (BMMC). Teste SAM, FDR < 0,001. Valores representam a razão da diferença de expressão que atingiu nível de significância.

Gene Symbol	Gene Name	CAF/N+	CAF/BMMC	N+/BMMC
CD59	CD59 molecule, complement regulatory protein		-22.27	-25.41
PRICKLE1	prickle homolog 1 (Drosophila)		-23.47	-22.36
SMOC2	SPARC related modular calcium binding 2		-17.99	-16.46
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61		-11.56	-13.62
FAM160B1	family with sequence similarity 160, member B1		-10.46	-12.09
C1QC	complement component 1, q subcomponent, C chain		-11.21	-10.38
CTA-221G9.4	NA		-8.28	-11.40
CPE	carboxypeptidase E		-9.61	-8.28
EFEMP1	EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1		-8.69	-8.86
PLA2G5	phospholipase A2, group V		-7.60	-8.42
LOX	lysyl oxidase		-7.79	-8.06
TMEM9	transmembrane protein 9		-7.10	-5.93
ERMAP	erythroblast membrane-associated protein (Scianna blood group)		-6.77	-5.71
ENDOD1	endonuclease domain containing 1		-6.54	-5.34
FUCA1	fucosidase, alpha-L- 1, tissue	4.19		-5.72
LSM4	LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)		-5.96	-5.25
C10orf54	chromosome 10 open reading frame 54		-3.12	-7.94
HNMT	histamine N-methyltransferase		-3.92	-6.91
EYA2	eyes absent homolog 2 (Drosophila)	5.05		-5.40
ZFHX4	zinc finger homeobox 4		-4.47	-6.10
POFUT2	protein O-fucosyltransferase 2		-6.02	-4.30
ZNF516	zinc finger protein 516		-4.83	-5.47
MACF1	microtubule-actin crosslinking factor 1		-4.92	-4.95
TBC1D15	TBC1 domain family, member 15		-4.39	-5.47
PPM1H	protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1H		-3.52	-6.27

SHISA5	shisa homolog 5 (<i>Xenopus laevis</i>)	-4.06	-5.42
ERCC6	NA	-2.58	-4.70
LIMK2	LIM domain kinase 2	-3.50	-5.88
FAM107B	family with sequence similarity 107, member B	-3.52	-5.77
PRPF18	PRP18 pre-mRNA processing factor 18 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-4.69	-4.60
RC2-ST0168-016-B10	NA	-3.59	-4.78
ADCY2	adenylate cyclase 2 (brain)	-3.97	-4.34
ALG8	asparagine-linked glycosylation 8, alpha-1,3-glucosyltransferase homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-4.58	-3.72
ANTXR1	anthrax toxin receptor 1	-2.91	-5.34
KLF5	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	-4.56	-3.62
ZNF197	zinc finger protein 197	-4.28	-3.74
ASXL1	additional sex combs like 1 (<i>Drosophila</i>)	-4.43	-3.56
TCP11L1	t-complex 11 (mouse)-like 1	-4.55	-3.40
DNAH1	NA	-3.50	-4.38
ARID1B	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)	-3.34	-4.47
GPC1	glypican 1	-4.08	-3.53
PKIB	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta	-2.90	-4.65
EXD2	exonuclease 3'-5' domain containing 2	-3.20	-4.17
NSMCE2	non-SMC element 2, MMS21 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.89	-4.47
NEDD9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	-2.61	-4.75
TACC1	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	-3.54	-3.78
RP6-213H19.1	NA	-3.78	-3.52
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	-3.66	-3.44
IMPA2	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	-3.94	-3.03
MAN2A2	mannosidase, alpha, class 2A, member 2	-3.30	-3.63
NOTCH2	notch 2	-2.56	-3.46

SEPX1	selenoprotein X, 1		-3.71	-3.14
LTV1	LTV1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)		-3.42	
C1orf109	chromosome 1 open reading frame 109		-2.76	-3.97
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1		-3.32	-3.36
ICA1	islet cell autoantigen 1, 69kDa			-3.34
C17orf28	chromosome 17 open reading frame 28		-2.80	-3.86
LOC151534	hypothetical LOC151534	2.25	-2.03	-4.57
LIMCH1	LIM and calponin homology domains 1		-3.56	-3.02
DUSP18	dual specificity phosphatase 18			-3.24
SLC25A21	solute carrier family 25 (mitochondrial oxodicarboxylate carrier), member 21		-3.54	-2.93
KIF1A	kinesin family member 1A		-2.89	-3.52
EIF5B	eukaryotic translation initiation factor 5B		-3.85	-2.56
SHC1	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1			-3.20
PPP1R1C	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1C		-2.89	-3.49
USP16	ubiquitin specific peptidase 16		-3.34	-3.04
C1orf212	chromosome 1 open reading frame 212		-3.16	-3.19
SMG5	smg-5 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (<i>C. elegans</i>)		-3.36	-2.94
TSGA14	testis specific, 14		-2.97	-3.32
MRPS18A	mitochondrial ribosomal protein S18A		-2.21	-4.06
NAB1	NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)		-2.93	-3.26
NSDHL	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like			-3.09
MYH9	myosin, heavy chain 9, non-muscle		-3.04	-3.00
ITPK1	inositol-tetrakisphosphate 1-kinase		-2.96	-3.01
PPP2R3C	protein phosphatase 2, regulatory subunit B'', gamma		-2.77	-3.20
CYB5D2	cytochrome b5 domain containing 2		-2.50	-3.41
NQO2	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2		-2.70	-3.16
YIPF1	Yip1 domain family, member 1		-2.74	-3.11
RNF19A	ring finger protein 19A		-3.06	-2.78
TMEM30A	transmembrane protein 30A		-2.88	-2.95
GALNT3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-			-2.91

	acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3)		
TSSC1	tumor suppressing subtransferable candidate 1	-2.51	-3.28
TCTA	T-cell leukemia translocation altered gene	-3.01	-2.77
PM0- HN0073- 003-C11	NA	-2.74	-2.96
HDHD1	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1	-3.52	-2.14
ZSWIM3	zinc finger, SWIM-type containing 3		-2.80
POLQ	polymerase (DNA directed), theta	-2.76	
GLG1	golgi glycoprotein 1	-2.86	-2.65
PNPLA3	patatin-like phospholipase domain containing 3	-2.30	-3.21
CSF2RB	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte- macrophage)	-2.88	-2.53
DUSP1	NA	-2.65	-2.70
ATF6	activating transcription factor 6	-2.75	-2.59
DCAF8	DDB1 and CUL4 associated factor 8	-2.46	-2.84
TOX3	TOX high mobility group box family member 3	-2.33	-2.97
SLC41A3	solute carrier family 41, member 3		-2.65
KIAA1737	KIAA1737	-2.59	-2.69
CD97	CD97 molecule	-2.62	-2.65
NLN	neurolysin (metallopeptidase M3 family)	-2.26	-3.01
SLC13A4	solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 4	-2.68	-2.57
GATM	glycine amidinotransferase (L- arginine:glycine amidinotransferase)	-3.14	-2.10
FAM134C	family with sequence similarity 134, member C	-2.60	-2.52
C10orf76	chromosome 10 open reading frame 76		-2.56
XRCC3	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3	-2.56	
DCXR	dicarbonyl/L-xylulose reductase	2.45	-2.55
UBA2	ubiquitin-like modifier activating enzyme 2	-2.70	-2.35
EXOSC9	exosome component 9	-2.26	-2.74
TXNRD1	thioredoxin reductase 1	-2.76	-2.24
HECTD1	HECT domain containing 1	-2.00	-3.00

C1orf91	NA		-3.00	-1.99
ORC4	origin recognition complex, subunit 4	1.81		-2.49
ADORA3	adenosine A3 receptor			-2.49
NFE2L1	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1		-2.63	-2.33
MTHFS	5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase (5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase)	2.58		-2.48
AGPAT3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3		-2.39	-2.55
C19orf42	chromosome 19 open reading frame 42		-2.47	
PPFIA1	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1		-2.67	-2.26
LACTB2	lactamase, beta 2		-2.55	-2.35
NFU1	NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog (S. cerevisiae)		-2.11	-2.78
SEC62	SEC62 homolog (S. cerevisiae)		-2.34	-2.53
SLC1A3	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3		-2.95	-1.90
CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2			-2.42
ATP6V1C1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C1		-2.24	-2.60
C20orf11	chromosome 20 open reading frame 11		-2.26	-2.56
CYB5R4	cytochrome b5 reductase 4		-2.15	-2.66
FBXO42	F-box protein 42		-2.40	
GDE1	glycerophosphodiester phosphodiesterase 1			-2.39
PIK3R4	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4		-2.40	-2.38
EMG1	EMG1 nucleolar protein homolog (S. cerevisiae)		-2.38	-2.37
MRPS15	mitochondrial ribosomal protein S15		-2.37	
LMBRD2	LMBR1 domain containing 2		-2.43	-2.28
HOXB9	homeobox B9		-2.48	-2.24
SH3BP4	SH3-domain binding protein 4		-2.33	-2.38
PPIL1	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 1		-2.50	-2.19
NT5C2	5'-nucleotidase, cytosolic II		-2.59	-2.09
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2		-2.28	-2.39
RRNAD1	ribosomal RNA adenine dimethylase domain containing 1		-2.33	
NBN	nibrin	-2.00	-2.33	

DCAF6	DDB1 and CUL4 associated factor 6		-2.32
YME1L1	YME1-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.47	-2.08
CMIP	c-Maf-inducing protein	-2.46	-2.09
SYT17	synaptotagmin XVII		-2.25
ATIC	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	-2.24	
MORC3	MORC family CW-type zinc finger 3	-2.27	-2.17
CLCN4	chloride channel 4	-1.99	-2.45
RMST	rhabdomyosarcoma 2 associated transcript (non-protein coding)		-2.20
PPP1R8	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 8	-2.02	-2.25
SYTL2	synaptotagmin-like 2	-2.01	-2.19
IQCE	IQ motif containing E	-2.07	
APOBEC1	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1	-2.09	-2.04
FAM178A	family with sequence similarity 178, member A		-2.05
MOAP1	modulator of apoptosis 1	-1.93	-2.00
DNAJC12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12		-1.93
CTIF	CBP80/20-dependent translation initiation factor	-1.88	
VCAN	versican	-1.86	
CDK5RAP2	CDK5 regulatory subunit associated protein 2	-2.01	-1.86
ZNF574	zinc finger protein 574		1.85
SRCAP	Snf2-related CREBBP activator protein	1.86	1.87
MIS12	MIS12, MIND kinetochore complex component, homolog (<i>S. pombe</i>)	1.94	1.79
DDX20	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20	1.85	1.90
CCDC93	coiled-coil domain containing 93	1.99	1.87
TRIM47	tripartite motif containing 47	2.01	1.89
C3orf63	chromosome 3 open reading frame 63	2.03	1.96
CUX2	cut-like homeobox 2	2.00	
GPATCH8	G patch domain containing 8		2.08
BRD1	NA	2.11	2.08
SLC25A19	solute carrier family 25 (mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier), member 19	2.04	2.16
MTOR	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	2.32	1.93

RTKN	rhotekin		2.15
C19orf66	chromosome 19 open reading frame 66		2.16
NUP50	nucleoporin 50kDa	2.46	1.87
ADC	arginine decarboxylase	2.03	2.21
MSL2	male-specific lethal 2 homolog (Drosophila)	2.06	2.38
KIF3C	kinesin family member 3C	2.41	2.11
SMG7	smg-7 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C. elegans)	2.47	2.06
WIZ	widely interspaced zinc finger motifs	2.35	2.20
MKRN2	makorin ring finger protein 2		2.28
KLHL5	kelch-like 5 (Drosophila)	2.20	2.37
TRIP10	thyroid hormone receptor interactor 10		2.30
PRSS21	protease, serine, 21 (testisin)	2.25	2.40
ACTR5	ARP5 actin-related protein 5 homolog (yeast)	2.20	2.46
C12orf11	chromosome 12 open reading frame 11	2.29	2.43
ZNF331	zinc finger protein 331	2.42	2.32
KCNH8	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 8	1.93	2.96
SMYD3	SET and MYND domain containing 3	2.28	2.64
HAUS8	HAUS augmin-like complex, subunit 8	2.91	2.06
LMAN2L	lectin, mannose-binding 2-like	2.06	2.92
KHDRBS3	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3	2.27	2.72
CORO1C	coronin, actin binding protein, 1C		2.50
CELF2	CUGBP, Elav-like family member 2	2.06	3.00
GOSR2	golgi SNAP receptor complex member 2	2.63	2.44
CCDC8	coiled-coil domain containing 8	3.29	1.79
EIF2AK4	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4	2.76	2.33
NAE1	NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1	2.51	2.61
ZNF606	zinc finger protein 606	2.61	2.54
OLFM4	olfactomedin 4		2.59
STK25	serine/threonine kinase 25	2.81	2.41
RPS11	ribosomal protein S11	3.41	1.83
GTPBP10	GTP-binding protein 10 (putative)	3.21	2.14
C12orf32	chromosome 12 open reading frame 32	2.33	3.04
COMMD3	COMM domain containing 3	2.25	3.17

CM1-ST0181-035-A04	NA		2.78	2.64
HR	hairless homolog (mouse)		3.02	2.41
COASY	CoA synthase		2.83	2.62
TOMM20	translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast)			2.78
CKMT1A	creatine kinase, mitochondrial 1A		2.55	3.03
CDCA7L	cell division cycle associated 7-like		2.47	3.17
PXMP2	peroxisomal membrane protein 2, 22kDa		2.86	2.82
ANKRD2	ankyrin repeat domain 2 (stretch responsive muscle)		2.78	3.00
PDCD7	programmed cell death 7		2.57	3.32
LPIN1	lipin 1		2.82	3.08
KDM1A	lysine (K)-specific demethylase 1A	2.72	2.96	
MSL1	male-specific lethal 1 homolog (Drosophila)		3.38	2.68
SMPD4	sphingomyelin phosphodiesterase 4, neutral membrane (neutral sphingomyelinase-3)		2.99	3.12
PPAP2C	phosphatidic acid phosphatase type 2C		2.90	3.24
PYCARD	PYD and CARD domain containing		3.30	2.89
PTPRG	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G		3.04	3.22
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4		2.98	3.30
UBE3B	ubiquitin protein ligase E3B		2.95	3.33
DCUN1D5	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 5 (S. cerevisiae)		3.72	2.57
CPSF7	cleavage and polyadenylation specific factor 7, 59kDa		3.21	3.09
SDK1	sidekick homolog 1, cell adhesion molecule (chicken)		3.42	2.98
LPCAT1	lysophosphatidylcholine acyltransferase 1		3.61	2.95
SNX5	sorting nexin 5		3.29	3.27
RGS12	regulator of G-protein signaling 12		2.86	3.79
RBMS3	RNA binding motif, single stranded interacting protein 3		2.87	3.88
S100A14	S100 calcium binding protein A14		3.97	2.83
ELL2	elongation factor, RNA polymerase II, 2		3.00	3.81
GART	phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylaminoimidazole synthetase		3.71	3.15
SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	-3.24		3.53

SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9	2.92	3.59	
UBE2J1	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1, U		3.22	3.98
KLF11	Kruppel-like factor 11		3.64	3.78
GSTM5	glutathione S-transferase mu 5	3.48	3.74	
GALC	galactosylceramidase	2.59	3.77	
C3	complement component 3		4.92	2.67
SLC7A8	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 8		3.39	4.32
TSC22D3	TSC22 domain family, member 3		5.97	2.15
RPL27	ribosomal protein L27	3.17	4.08	
SF3A2	splicing factor 3a, subunit 2, 66kDa		4.35	3.87
ELK3	NA		4.14	4.20
NEURL	neuralized homolog (Drosophila)		6.06	2.40
TKT	transketolase		5.46	3.46
MDM4	Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse)		5.29	4.18
NIPSNAP1	nipsnap homolog 1 (C. elegans)		5.46	4.20
GPRC5B	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B		6.92	2.77
ABI2	abl-interactor 2		3.89	5.84
SF3B4	splicing factor 3b, subunit 4, 49kDa		5.22	4.83
SPOCK1	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1		3.71	6.66
IDH1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble		5.81	4.65
SLC44A1	solute carrier family 44, member 1		4.13	6.34
GGCT	gamma-glutamylcyclotransferase		5.43	5.05
GRB7	growth factor receptor-bound protein 7		5.47	5.02
FEN1	flap structure-specific endonuclease 1		5.18	5.35
FADS1	fatty acid desaturase 1		5.48	5.15
SYK	spleen tyrosine kinase		5.96	4.96
CDA	cytidine deaminase		6.50	4.86
COL6A3	collagen, type VI, alpha 3		6.98	4.69
EVPL	envoplakin		4.99	7.20
NELL1	NEL-like 1 (chicken)	-1.98	4.59	9.10
FBXL14	F-box and leucine-rich repeat protein 14		6.55	8.20
PDZD2	PDZ domain containing 2		7.97	10.20
CTSC	cathepsin C	-3.95		9.45
CTCF	CCCTC-binding factor (zinc finger protein)		9.53	9.70
ATP6AP1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 1		8.77	10.72
TMC4	transmembrane channel-like 4		11.64	9.59
TIMELESS	timeless homolog (Drosophila)	-2.65	8.70	23.08
PLXND1	plexin D1		22.49	30.07

Tabela 2. Comparação de dados de perfil de expressão gênica de acordo com características clínicas. Fibroblastos de pacientes com câncer de mama foram comparados de acordo com algumas características clínicas. FC: diferença de expressão. Representados apenas genes que atingiram diferença significativa, teste SAM, FDR < 0,01.

Estadio I e II (mais expressos) vs. estadio III		
Gene Symbol	Gene Name	FC
ACTN4	actinin, alpha 4	3.99
NRN1	neuritin 1	2.45
DCUN1D4	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	2.46

Ausência (mais expressos) vs. presença de metástase linfonodal		
Gene Symbol	Gene Name	FC
NRN1	neuritin 1	2.27
COPE	coatomer protein complex, subunit epsilon	2.18
DCUN1D4	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	2.16
S100P	S100 calcium binding protein P	1.96
BLCAP	bladder cancer associated protein	1.81

Tumores c-ErbB2 + (mais expressos) vs. c-ErbB2-		
Gene Symbol	Gene Name	FC
TTLL1	tubulin tyrosine ligase-like family, member 1	1.93
SLC29A1	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	1.59

Menos de 50 anos (mais expressos) vs. mais de 50 anos		
Gene Symbol	Gene Name	FC
AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein 12	3.82
ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	3.71
EMP1	epithelial membrane protein 1	3.18
IPO7	importin 7	2.39
NOLC1	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	2.26
FUBP3	far upstream element (FUSE) binding protein 3	1.70
ZNF295	zinc finger protein 295	1.67

Tabela 3. Funções enriquecidas entre os 267 genes diferencialmente expressos entre CAF, N+ e BMMC. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	Count	%	PValue
GO:0043167~ion binding	81.000	31.395	0.003
GO:0043169~cation binding	79.000	30.620	0.004
GO:0046872~metal ion binding	78.000	30.233	0.006
hydrolase	38.000	14.729	0.016
zinc finger region:C2H2-type 16	4.000	1.550	0.024
GO:0005681~spliceosome	7.000	2.713	0.028
metal-binding	56.000	21.705	0.029
GO:0030529~ribonucleoprotein complex	14.000	5.426	0.044
GO:0005578~proteinaceous extracellular matrix	8.000	3.101	0.045
compositionally biased region:Asp/Glu-rich (acidic)	7.000	2.713	0.048
GO:0048729~tissue morphogenesis	6.000	2.326	0.051
zinc finger region:C2H2-type 10	7.000	2.713	0.055
zinc finger region:C2H2-type 9	7.000	2.713	0.055
magnesium	13.000	5.039	0.057
GO:0001704~formation of primary germ layer	3.000	1.163	0.058
GO:0001707~mesoderm formation	3.000	1.163	0.058
zinc finger region:C2H2-type 20	3.000	1.163	0.060
Spliceosome	6.000	2.326	0.064
zinc finger region:C2H2-type 8	8.000	3.101	0.066
GO:0016071~mRNA metabolic process	13.000	5.039	0.071
region of interest:Substrate binding	6.000	2.326	0.072
domain:EGF-like 5; calcium-binding	4.000	1.550	0.074
zinc finger region:C2H2-type 14	4.000	1.550	0.074
GO:0000287~magnesium ion binding	13.000	5.039	0.077
zinc finger region:C2H2-type 11	6.000	2.326	0.082
GO:0031012~extracellular matrix	8.000	3.101	0.083
GO:0048332~mesoderm morphogenesis	3.000	1.163	0.083
domain:Cytochrome b5 heme-binding	3.000	1.163	0.085
zinc finger region:C2H2-type 18	3.000	1.163	0.085
zinc finger region:C2H2-type 17	3.000	1.163	0.085
GO:0030246~carbohydrate binding	9.000	3.488	0.086
IPR001199:Cytochrome b5	3.000	1.163	0.088
GO:0016814~hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds, in cyclic amidines	3.000	1.163	0.090
metal ion-binding site:Magnesium 1	4.000	1.550	0.091
metal ion-binding site:Magnesium 2	4.000	1.550	0.091
GO:0044420~extracellular matrix part	4.000	1.550	0.095

Tabela 4. Funções enriquecidas entre os genes diferencialmente **menos** expressos em **CAFs** quando comparados com N+. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
DNA damage	0.0053	NBN, ERCC6, TIMELESS
short sequence motif:Nuclear localization signal	0.0113	NBN, SGK1, ERCC6
GO:0012502~induction of programmed cell death	0.0208	NOTCH2, ERCC6, NELL1
GO:0006917~induction of apoptosis	0.0208	NOTCH2, ERCC6, NELL1
disease mutation	0.0242	NOTCH2, NBN, ERCC6, CTSC
GO:0006974~response to DNA damage stimulus	0.0256	NBN, ERCC6, TIMELESS
domain:EGF-like 4	0.0257	NOTCH2, NELL1
domain:EGF-like 5; calcium-binding	0.0280	NOTCH2, NELL1
GO:0043068~positive regulation of programmed cell death	0.0339	NOTCH2, ERCC6, NELL1
GO:0043065~positive regulation of apoptosis	0.0339	NOTCH2, ERCC6, NELL1
GO:0010942~positive regulation of cell death	0.0345	NOTCH2, ERCC6, NELL1
domain:EGF-like 3	0.0372	NOTCH2, NELL1
IPR013091:EGF calcium-binding	0.0380	NOTCH2, NELL1
GO:0002009~morphogenesis of an epithelium	0.0443	NOTCH2, TIMELESS
sequence variant	0.0476	NOTCH2, NBN, SGK1, ERCC6, TIMELESS, NELL1, CTSC, CDK5RAP2
GO:0048589~developmental growth	0.0500	NOTCH2, NBN
domain:EGF-like 1	0.0508	NOTCH2, NELL1
IPR000152:EGF-type aspartate/asparagine hydroxylation conserved site	0.0529	NOTCH2, NELL1
IPR001881:EGF-like calcium-binding	0.0529	NOTCH2, NELL1
IPR018097:EGF-like calcium-binding, conserved site	0.0529	NOTCH2, NELL1
GO:0022402~cell cycle process	0.0539	NOTCH2, NBN, TIMELESS
GO:0033554~cellular response to stress	0.0570	NBN, ERCC6, TIMELESS
GO:0047485~protein N-terminus binding	0.0651	NBN, ERCC6
GO:0042127~regulation of cell proliferation	0.0657	NOTCH2, NBN, TIMELESS
SM00179:EGF_CA	0.0664	NOTCH2, NELL1
GO:0045664~regulation of neuron differentiation	0.0700	NBN, CDK5RAP2
GO:0042770~DNA damage response, signal transduction	0.0700	NBN, ERCC6
GO:0048729~tissue morphogenesis	0.0728	NOTCH2, TIMELESS

IPR000742:EGF-like, type 3	0.0772	NOTCH2, NELL1
GO:0007050~cell cycle arrest	0.0812	NOTCH2, NBN
GO:0042981~regulation of apoptosis	0.0827	NOTCH2, ERCC6, NELL1
GO:0043067~regulation of programmed cell death	0.0836	NOTCH2, ERCC6, NELL1
GO:0050767~regulation of neurogenesis	0.0840	NBN, CDK5RAP2
egf-like domain	0.0841	NOTCH2, NELL1
IPR006210:EGF-like	0.0844	NOTCH2, NELL1
GO:0010941~regulation of cell death	0.0845	NOTCH2, ERCC6, NELL1
GO:0051960~regulation of nervous system development	0.0868	NBN, CDK5RAP2
GO:0007049~cell cycle	0.0890	NOTCH2, NBN, TIMELESS
GO:0044454~nuclear chromosome part	0.0999	NBN, TIMELESS

Tabela 5. Funções enriquecidas entre os genes diferencialmente **mais** expressos em **CAFs** quando comparados com N+. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
GO:0001708~cell fate specification	0.034	EYA2, SOX9
glycosidase	0.048	GALC, FUCA1
GO:0045165~cell fate commitment	0.063	EYA2, SOX9
GO:0006732~coenzyme metabolic process	0.076	MTHFS, DCXR
lysosome	0.093	GALC, FUCA1

Tabela 6. Funções enriquecidas entre os genes diferencialmente **menos** expressos em **CAFs** quando comparados com BMMC. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
GO:0043167~ion binding	0.002	SEPX1, CYB5R4, IMPA2, ZNF516, APOBEC1, ADCY2, CD97, SMOC2, MACF1, MORC3, NT5C2, NSMCE2, LOX, USP16, ITPK1, NQO2, HECTD1, KLF5, LIMK2, RNF19A, ASXL1, EFEMP1, ENDOD1, LACTB2, MAN2A2, NOTCH2, NFU1, ZFH4, PRICKLE1, CPE, ZNF197, PPP1R8, LIMCH1, NLN, VCAN, SYTL2, YME1L1, ANTXR1, SLC13A4, TNFAIP3, CYB5D2, PPP2R3C, PLA2G5, CLCN4
GO:0046872~metal ion binding	0.003	CYB5R4, SEPX1, IMPA2, ZNF516, APOBEC1, ADCY2, CD97, SMOC2, MACF1, MORC3, NT5C2, NSMCE2, LOX, USP16, ITPK1, NQO2, HECTD1, KLF5, LIMK2, RNF19A, ASXL1, EFEMP1, ENDOD1, LACTB2, MAN2A2, NOTCH2, NFU1, ZFH4, PRICKLE1, CPE, ZNF197, PPP1R8, LIMCH1, NLN, VCAN, SYTL2, YME1L1, ANTXR1, SLC13A4, TNFAIP3, CYB5D2, PPP2R3C, PLA2G5
GO:0043169~cation binding	0.003	CYB5R4, SEPX1, IMPA2, ZNF516, APOBEC1, ADCY2, CD97, SMOC2, MACF1, MORC3, NT5C2, NSMCE2, LOX, USP16, ITPK1, NQO2, HECTD1, KLF5, LIMK2, RNF19A, ASXL1, EFEMP1, ENDOD1, LACTB2, MAN2A2, NOTCH2, NFU1, ZFH4, PRICKLE1, CPE, ZNF197, PPP1R8, LIMCH1, NLN, VCAN, SYTL2, YME1L1, ANTXR1, SLC13A4, TNFAIP3, CYB5D2, PPP2R3C, PLA2G5
hydrolase	0.015	TMPRSS2, IMPA2, APOBEC1, EXOSC9, ENDOD1, EXD2, PNPLA3, LACTB2, MAN2A2, ERCC6, CPE, ATIC, PPP1R8, PPM1H, NT5C2, YME1L1, NLN, TNFAIP3, POLQ, USP16, ITPK1, PLA2G5
GO:0031099~regeneration	0.018	NOTCH2, GATM, ATIC, VCAN
GO:0005578~proteinaceous extracellular matrix	0.022	SMOC2, SLC1A3, EFEMP1, VCAN, LOX, GPC1

GO:0005576~extracellular region	0.025	TMPRSS2, EFEMP1, ENDOD1, C1QC, CD97, SMOC2, TBC1D15, SLC1A3, CPE, CD59, VCAN, LOX, GPC1, PLA2G5, CYR61
compositionally biased region:Poly-Lys	0.028	ATF6, PRICKLE1, ASXL1, EIF5B, TOX3, IQCE
GO:0015630~microtubule cytoskeleton	0.033	KIF1A, MACF1, RNF19A, NEDD9, DNAH1, CDK5RAP2, TNFAIP3, MYH9, TSGA14, TACC1
GO:0031012~extracellular matrix	0.036	SMOC2, SLC1A3, EFEMP1, VCAN, LOX, GPC1
Secreted	0.040	TMPRSS2, EFEMP1, ENDOD1, C1QC, CD97, SMOC2, CPE, CD59, VCAN, LOX, GPC1, PLA2G5, CYR61
SM00240:FHA	0.049	KIF1A, NBN, PPP1R8
GO:0009611~response to wounding	0.051	CD97, NOTCH2, SLC1A3, GATM, CD59, NFE2L1, VCAN, LOX, C1QC
SM00179:EGF_CA	0.051	CD97, NOTCH2, EFEMP1, VCAN
IPR000253:Forkhead-associated	0.054	KIF1A, NBN, PPP1R8
IPR000152:EGF-type aspartate/asparagine hydroxylation conserved site	0.059	CD97, NOTCH2, EFEMP1, VCAN
IPR018097:EGF-like calcium-binding, conserved site	0.059	CD97, NOTCH2, EFEMP1, VCAN
IPR001881:EGF-like calcium-binding	0.059	CD97, NOTCH2, EFEMP1, VCAN
domain:FHA	0.062	KIF1A, NBN, PPP1R8
cataract	0.063	ERCC6, VCAN, MYH9
GO:0048729~tissue morphogenesis	0.068	NOTCH2, MACF1, TXNRD1, HECTD1
metal-binding	0.071	CYB5R4, SEPX1, ZNF516, IMPA2, APOBEC1, ADCY2, MORC3, NT5C2, NSMCE2, LOX, ITPK1, USP16, NQO2, KLF5, LIMK2, RNF19A, ASXL1, LACTB2, MAN2A2, ZFXH4, CPE, PRICKLE1, ZNF197, LIMCH1, YME1L1, NLN, ANTXR1, TNFAIP3, PLA2G5
GO:0030705~cytoskeleton-dependent intracellular transport	0.074	KIF1A, MACF1, MYH9
nuclease	0.076	EXOSC9, PPP1R8, EXD2, ENDOD1
GO:0030247~polysaccharide binding	0.084	FGFR1, VCAN, PLA2G5, CYR61
GO:0005539~glycosaminoglycan binding	0.084	FGFR1, VCAN, PLA2G5, CYR61
GO:0001871~pattern binding	0.084	FGFR1, VCAN, PLA2G5, CYR61
GO:0000904~cell morphogenesis involved in differentiation	0.085	SLC1A3, MACF1, VCAN, ANTXR1, MYH9

GO:0048598~embryonic morphogenesis	0.085	NOTCH2, MACF1, TXNRD1, C17ORF28, HECTD1
compositionally biased region:Poly-Ser	0.085	ATF6, NOTCH2, ZFH4, MACF1, ASXL1, NFE2L1, ARID1B, KIAA1737
domain:EGF-like 5; calcium-binding	0.086	CD97, NOTCH2, EFEMP1
signal peptide	0.098	GLG1, C10ORF54, FGFR1, TMEM9, EFEMP1, ENDOD1, C1QC, ERMAP, CD97, SMOC2, NOTCH2, CPE, CD59, SHISA5, CSF2RB, POFUT2, VCAN, ANTXR1, LOX, C19ORF42, GPC1, PLA2G5, CYR61
metal ion-binding site:Magnesium 1	0.099	IMPA2, ADCY2, ITPK1
metal ion-binding site:Magnesium 2	0.099	IMPA2, ADCY2, ITPK1

Tabela 7. Funções enriquecidas entre os genes diferencialmente **mais** expressos em **CAFs** quando comparados com BMMC. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
GO:0045934~negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	0.0183	KDM1A, TIMELESS, KLF11, HR, CDA, CTCF, DDX20, CUX2, MDM4, SOX9
GO:0051172~negative regulation of nitrogen compound metabolic process	0.0213	KDM1A, TIMELESS, KLF11, HR, CDA, CTCF, DDX20, CUX2, MDM4, SOX9
hsa00480:Glutathione metabolism	0.0267	GGCT, IDH1, GSTM5
GO:0016481~negative regulation of transcription	0.0285	KDM1A, TIMELESS, KLF11, HR, CTCF, DDX20, CUX2, MDM4, SOX9
GO:0010558~negative regulation of macromolecule biosynthetic process	0.0310	KDM1A, TIMELESS, KLF11, HR, CTCF, DDX20, CUX2, MDM4, SOX9, EIF2AK4
GO:0031327~negative regulation of cellular biosynthetic process	0.0338	KDM1A, TIMELESS, KLF11, HR, CTCF, DDX20, CUX2, MDM4, SOX9, EIF2AK4
chromatin regulator	0.0368	BRD1, KDM1A, MSL1, SMYD3, CTCF, SRCAP
GO:0009890~negative regulation of biosynthetic process	0.0369	KDM1A, TIMELESS, KLF11, HR, CTCF, DDX20, CUX2, MDM4, SOX9, EIF2AK4
hsa00600:Sphingolipid metabolism	0.0411	PPAP2C, GALC, SMPD4
GO:0051253~negative regulation of RNA metabolic process	0.0513	KDM1A, KLF11, CTCF, DDX20, CUX2, MDM4, SOX9
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-dependent	0.0513	KDM1A, KLF11, CTCF, DDX20, CUX2, MDM4, SOX9
GO:0010629~negative regulation of gene expression	0.0516	KDM1A, TIMELESS, KLF11, HR, CTCF, DDX20, CUX2, MDM4, SOX9
GO:0005681~spliceosome	0.0648	DDX20, SF3A2, SF3B4, PDCD7
IPR001804:Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase	0.0651	NELL1, IDH1
GO:0043933~macromolecular complex subunit organization	0.0732	HR, CDA, ABI2, CTCF, DDX20, MDM4, SF3A2, MIS12, SYK
h_ctcfPathway:CTCF: First Multivalent Nuclear Factor	0.0763	CTCF, MTOR
GO:0030529~ribonucleoprotein complex	0.0820	RPL27, RPS11, DDX20, SF3A2, SF3B4, PDCD7, EIF2AK4
zinc finger region:C2H2-type 10	0.0913	CTCF, ZNF606, ZNF331, WIZ
zinc finger region:C2H2-type 9	0.0913	CTCF, ZNF606, ZNF331, WIZ
GO:0016071~mRNA metabolic process	0.0935	KHDRBS3, SMG7, CPSF7, CELF2, DDX20, SF3A2, SF3B4
compositionally biased region:Gln/Pro-rich	0.0950	SMG7, SOX9

IPR002343:Paraneoplastic encephalomyelitis antigen	0.0961	RBMS3, CELF2
GO:0010605~negative regulation of macromolecule metabolic process	0.0996	KDM1A, TIMELESS, KLF11, HR, CTCF, DDX20, CUX2, MDM4, SOX9, EIF2AK4

Tabela 8. Funções enriquecidas entre os genes diferencialmente **menos** expressos em **N+** quando comparados com BMMC. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
GO:0043167~ion binding	0.001	GALNT3, SEPX1, CYB5R4, IMPA2, ZNF516, ADCY2, APOBEC1, CD97, MTHFS, SMOC2, MACF1, MORC3, NT5C2, NSMCE2, LOX, USP16, ITPK1, NQO2, HECTD1, KLF5, GDE1, LIMK2, RNF19A, EFEMP1, ASXL1, ENDOD1, ZSWIM3, LACTB2, MAN2A2, NFU1, ZFHx4, EYA2, PRICKLE1, CPE, ZNF197, PPP1R8, LIMCH1, NLN, SYTL2, YME1L1, ANTXR1, SLC13A4, TNFAIP3, CYB5D2, SYT17, PPP2R3C, PLA2G5, CLCN4
GO:0046872~metal ion binding	0.001	GALNT3, SEPX1, CYB5R4, IMPA2, ZNF516, APOBEC1, ADCY2, CD97, MTHFS, SMOC2, MACF1, MORC3, NT5C2, NSMCE2, LOX, USP16, ITPK1, NQO2, HECTD1, KLF5, GDE1, LIMK2, RNF19A, EFEMP1, ASXL1, ENDOD1, ZSWIM3, LACTB2, MAN2A2, NFU1, ZFHx4, EYA2, PRICKLE1, CPE, ZNF197, PPP1R8, LIMCH1, NLN, SYTL2, YME1L1, ANTXR1, SLC13A4, TNFAIP3, CYB5D2, SYT17, PPP2R3C, PLA2G5
GO:0043169~cation binding	0.001	GALNT3, SEPX1, CYB5R4, IMPA2, ZNF516, APOBEC1, ADCY2, CD97, MTHFS, SMOC2, MACF1, MORC3, NT5C2, NSMCE2, LOX, USP16, ITPK1, NQO2, HECTD1, KLF5, GDE1, LIMK2, RNF19A, EFEMP1, ASXL1, ENDOD1, ZSWIM3, LACTB2, MAN2A2, NFU1, ZFHx4, EYA2, PRICKLE1, CPE, ZNF197, PPP1R8, LIMCH1, NLN, SYTL2, YME1L1, ANTXR1, SLC13A4, TNFAIP3, CYB5D2, SYT17, PPP2R3C, PLA2G5
hydrolase	0.013	TMPrSS2, IMPA2, EXOSC9, APOBEC1, GDE1, EXD2, ENDOD1, PNPLA3, FUCA1, LACTB2, MAN2A2, DUSP18, EYA2, CPE, PPP1R8, PPM1H, NT5C2, YME1L1, NLN, TNFAIP3, ITPK1, USP16, PLA2G5
GO:0001704~formation of primary germ layer	0.015	EYA2, MACF1, TXNRD1
GO:0001707~mesoderm formation	0.015	EYA2, MACF1, TXNRD1

metal-binding	0.018	CYB5R4, SEPX1, IMPA2, ZNF516, APOBEC1, ADCY2, MORC3, NT5C2, NSMCE2, LOX, ITPK1, USP16, NQO2, KLF5, LIMK2, GDE1, RNF19A, ASXL1, ZSWIM3, LACTB2, MAN2A2, ZFH4, EYA2, PRICKLE1, CPE, ZNF197, LIMCH1, YME1L1, NLN, ANTXR1, TNFAIP3, SYT17, PLA2G5
GO:0048332~mesoderm morphogenesis	0.022	EYA2, MACF1, TXNRD1
magnesium	0.033	FGFR1, MTHFS, IMPA2, ADCY2, EYA2, GDE1, PPP1R8, NT5C2, ITPK1
active site:Nucleophile	0.036	MAN2A2, SEPX1, EYA2, CPE, NT5C2
GO:0016021~integral to membrane	0.045	GALNT3, C1ORF91, GLG1, FGFR1, ADORA3, ADCY2, ALG8, SEC62, SLC25A21, CD97, SLC1A3, SHISA5, CSF2RB, GPC1, AGPAT3, TMEM30A, NSDHL, C17ORF28, C10ORF54, TMPRSS2, GDE1, RNF19A, TMEM9, C1ORF212, MYH9, C10ORF76, LMBRD2, PNPLA3, ERMAP, MAN2A2, ATF6, FAM134C, SLC41A3, ANTXR1, SLC13A4, CYB5D2, SYT17, CLCN4, YIPF1
GO:0031224~intrinsic to membrane	0.053	GALNT3, C1ORF91, GLG1, FGFR1, ADORA3, ADCY2, ALG8, SEC62, SLC25A21, CD97, SLC1A3, SHISA5, CSF2RB, GPC1, AGPAT3, TMEM30A, NSDHL, C17ORF28, C10ORF54, TMPRSS2, GDE1, RNF19A, TMEM9, C1ORF212, MYH9, C10ORF76, LMBRD2, PNPLA3, ERMAP, MAN2A2, ATF6, FAM134C, CD59, SLC41A3, ANTXR1, SLC13A4, CYB5D2, SYT17, CLCN4, YIPF1
GO:0007369~gastrulation	0.059	EYA2, MACF1, TXNRD1
GO:0009611~response to wounding	0.066	CD97, SLC1A3, ADORA3, GATM, CD59, NFE2L1, LOX, C1QC, SYT17
GO:0005576~extracellular region	0.076	TMPRSS2, EFEMP1, ENDOD1, C1QC, CD97, SMOC2, TBC1D15, SLC1A3, CPE, CD59, LOX, GPC1, PLA2G5, CYR61
GO:0048729~tissue morphogenesis	0.077	EYA2, MACF1, TXNRD1, HECTD1
GO:0007498~mesoderm development	0.082	EYA2, MACF1, TXNRD1
GO:0030705~cytoskeleton-dependent intracellular transport	0.082	KIF1A, MACF1, MYH9
GO:0030246~carbohydrate binding	0.084	GALNT3, MAN2A2, FGFR1, FUCA1, PLA2G5, CYR61
nuclease	0.085	EXOSC9, PPP1R8, EXD2, ENDOD1
GO:0005578~proteinaceous extracellular matrix	0.092	SMOC2, SLC1A3, EFEMP1, LOX, GPC1

transmembrane region	0.093	GALNT3, C1ORF91, GLG1, FGFR1, ADORA3, ADCY2, ALG8, SEC62, SLC25A21, CD97, SLC1A3, SHISA5, CSF2RB, AGPAT3, TMEM30A, NSDHL, C17ORF28, C10ORF54, TMPRSS2, GDE1, RNF19A, TMEM9, C1ORF212, C10ORF76, LMBRD2, PNPLA3, ERMAP, MAN2A2, ATF6, FAM134C, SLC41A3, ANTXR1, SLC13A4, CYB5D2, SYT17, CLCN4, YIPF1
GO:0000287~magnesium ion binding	0.094	MTHFS, IMPA2, ADCY2, EYA2, GDE1, PPP1R8, NT5C2, ITPK1
GO:0046914~transition metal ion binding	0.095	GALNT3, CYB5R4, SEPX1, ZNF516, APOBEC1, MORC3, NSMCE2, LOX, USP16, NQO2, KLF5, LIMK2, RNF19A, ASXL1, ZSWIM3, LACTB2, MAN2A2, NFU1, ZFHX4, CPE, PRICKLE1, ZNF197, LIMCH1, SYTL2, YME1L1, NLN, TNFAIP3, CYB5D2
GO:0048598~embryonic morphogenesis	0.099	EYA2, MACF1, TXNRD1, C17ORF28, HECTD1

Tabela 9. Funções enriquecidas entre os genes diferencialmente **mais** expressos em **N+** quando comparados com BMMC. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Term	PValue	Genes
zinc finger region:C2H2-type 9	0.025	CTCF, ZNF574, ZNF606, ZNF331, WIZ
Apoptosis	0.028	TSC22D3, SGK1, KLF11, PYCARD, RTKN, PDCD7, DDIT4, NAE1
GO:0006915~apoptosis	0.050	TSC22D3, SGK1, GGCT, KLF11, PYCARD, RTKN, MDM4, PDCD7, DDIT4, NAE1
GO:0012501~programmed cell death	0.052	TSC22D3, SGK1, GGCT, KLF11, PYCARD, RTKN, MDM4, PDCD7, DDIT4, NAE1
compositionally biased region:Pro-rich	0.052	TRIM47, KHDRBS3, MSL1, CPSF7, SDK1, RTKN, ABI2, ZNF574, SF3A2, SRCAP, PDCD7, WIZ
zinc-finger	0.055	BRD1, NEURL, KLF11, SMYD3, HR, CTCF, SF3A2, ZNF331, MKRN2, TRIM47, MSL2, MDM4, ZNF574, ZNF606, GPATCH8, WIZ
zinc finger region:RING-type	0.058	TRIM47, MSL2, NEURL, MDM4, MKRN2
zinc finger region:C2H2-type 8	0.058	CTCF, ZNF574, ZNF606, ZNF331, WIZ
GO:0016265~death	0.059	TSC22D3, SGK1, GGCT, ATP6AP1, KLF11, PYCARD, RTKN, MDM4, PDCD7, DDIT4, NAE1
GO:0008219~cell death	0.059	TSC22D3, SGK1, GGCT, ATP6AP1, KLF11, PYCARD, RTKN, MDM4, PDCD7, DDIT4, NAE1
IPR001804:Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase	0.067	NELL1, IDH1
GO:0005681~spliceosome	0.067	DDX20, SF3A2, SF3B4, PDCD7
repeat:REM	0.068	RTKN, TRIP10
zinc finger region:C2H2-type 11	0.069	ZNF574, ZNF606, ZNF331, WIZ
h_ctcfPathway:CTCF: First Multivalent Nuclear Factor	0.076	CTCF, MTOR
GO:0043933~macromolecular complex subunit organization	0.082	HR, CDA, ABI2, CTCF, DDX20, MDM4, SF3A2, MIS12, SYK
zinc finger region:C2H2-type 7	0.086	CTCF, ZNF574, ZNF606, ZNF331, WIZ
IPR015880:Zinc finger, C2H2-like	0.096	KLF11, CTCF, ZNF574, SF3A2, ZNF606, ZNF331, WIZ

Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study	0.098	RBMS3, KCNH8
IPR002343:Paraneoplastic encephalomyelitis antigen	0.099	RBMS3, CELF2

Tabela 10. Agrupamento de funções enriquecidas entre os genes diferencialmente expressos nos três sítios (tumor primário, linfonodo e medula óssea). Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7.

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 2.167		
Term	Count	%	PValue	
GO:0043167~ion binding	81	31.39535	0.003	
GO:0043169~cation binding	79	30.62016	0.004	
GO:0046872~metal ion binding	78	30.23256	0.006	
metal-binding	56	21.70543	0.029	

Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 1.314		
Term	Count	%	PValue	
GO:0005681~spliceosome	7	2.713178	0.028	
GO:0030529~ribonucleoprotein complex	14	5.426357	0.044	
Spliceosome	6	2.325581	0.064	
GO:0016071~mRNA metabolic process	13	5.03876	0.071	

Annotation Cluster 3		Enrichment Score: 1.210		
Term	Count	%	PValue	
GO:0048729~tissue morphogenesis	6	2.325581	0.051	
GO:0001704~formation of primary germ layer	3	1.162791	0.058	
GO:0001707~mesoderm formation	3	1.162791	0.058	
GO:0048332~mesoderm morphogenesis	3	1.162791	0.083	

Annotation Cluster 4		Enrichment Score: 1.209		
Term	Count	%	PValue	
zinc finger region:C2H2-type 16	4	1.550388	0.024	
zinc finger region:C2H2-type 9	7	2.713178	0.055	
zinc finger region:C2H2-type 10	7	2.713178	0.055	
zinc finger region:C2H2-type 20	3	1.162791	0.060	
zinc finger region:C2H2-type 8	8	3.100775	0.066	
zinc finger region:C2H2-type 14	4	1.550388	0.074	
zinc finger region:C2H2-type 11	6	2.325581	0.082	
zinc finger region:C2H2-type 18	3	1.162791	0.085	
zinc finger region:C2H2-type 17	3	1.162791	0.085	

Annotation Cluster 5		Enrichment Score: 1.151		
Term	Count	%	PValue	
GO:0005578~proteinaceous extracellular matrix	8	3.100775	0.045	
GO:0031012~extracellular matrix	8	3.100775	0.083	
GO:0044420~extracellular matrix part	4	1.550388	0.095	

Tabela 11. Valores dos Coeficientes de Correlação de Pearson entre os dados obtidos pelo “microarray” e os dados obtidos por RT-qPCR.

ADCY2	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	0.638 0.247 5
ANTXR1	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-0.579 0.229 6
CYR61	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-0.551 0.257 6
DNAH1	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	0.213 0.731 5
DUSP1	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-0.357 0.487 6
FGFR1	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-0.370 0.470 6
HECTD1	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-0,881 0.020 6
HNMT	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-0.293 .573 6
KLF5	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-0.354 0.491 6
LOX	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-0.562 0.246 6
MACF1	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-0.777 0.069 6
MYH9	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	0.107 0.841 6
NOTCH2	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	0.503 0.310 6
SLC1A3	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	0.508 0.303 6
TACC1	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-0.781 0.067 6
TXNRD1	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-0.190 0.719 6
USP16	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-0.161 0.761 6

Figura 1. Os 5% melhores genes “brokers”.

Figura 2. Os 5% melhores genes “bridges”.

9. Referências

Abba MC, Sun H, Hawkins K a, Drake J a, Hu Y, Nunez MI, et al. Breast cancer molecular signatures as determined by SAGE: correlation with lymph node status. *Molecular cancer research : MCR* [Internet]. 2007 Sep [cited 2010 Nov 17];5(9):881–90.

Allen M, Louise Jones J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *The Journal of pathology* [Internet]. 2011 Jan [cited 2012 Oct 8];223(2):162–76.

Bao J, Jana SS, Adelstein RS. Vertebrate nonmuscle myosin II isoforms rescue small interfering RNA-induced defects in COS-7 cell cytokinesis. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 2005 May 20 [cited 2012 Oct 8];280(20):19594–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15774463>

Barbe L, Lundberg E, Oksvold P, Stenius A, Lewin E, Björling E, et al. Toward a confocal subcellular atlas of the human proteome. *Molecular & cellular proteomics : MCP* [Internet]. 2008 Mar [cited 2012 Oct 8];7(3):499–508. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18029348>

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* [Internet]. 2008 [cited 2010 Jul 14];16(5):585–601. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19128254>

Bauer M, Su G, Casper C, He R, Rehrauer W, Friedl a. Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast. *Oncogene* [Internet]. 2010 Mar 25 [cited 2012 Apr 26];29(12):1732–40. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2845730&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Benvenuti TT. Influência de células epiteliais mamárias malignas na expressão gênica de células estromais originárias de linfonodo axilar comprometido ou não comprometido de pacientes com câncer de mama. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. p. 149.

Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *The New*

England journal of medicine [Internet]. 2005 Aug;353(8):793–802. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16120859>

Cadenas C, Franckenstein D, Schmidt M, Gehrmann M, Hermes M, Geppert B, et al. Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. Breast cancer research : BCR [Internet]. 2010 Jan;12(3):R44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2917039&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Cai JJ, Borenstein E, Petrov D a. Broker genes in human disease. Genome biology and evolution [Internet]. 2010 Jan [cited 2012 Oct 5];2:815–25. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2988523&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Cai SY, Babbitt RW, Marchesi VT. A mutant deubiquitinating enzyme (Ubp-M) associates with mitotic chromosomes and blocks cell division. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Internet]. 1999 Mar 16;96(6):2828–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15854&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Chang HY, Chi JT. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. Proceedings of the ... [Internet]. National Acad Sciences; 2002 [cited 2012 Oct 9];99(20):12877. Available from: <http://www.pnas.org/content/99/20/12877.short>

Chen Y, Du X-Y. Functional properties and intracellular signaling of CCN1/Cyr61. Journal of cellular biochemistry [Internet]. 2007 Apr 15 [cited 2012 Oct 8];100(6):1337–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17171641>

Cook KL, Metheny-Barlow LJ, Tallant EA, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) reduces fibrosis in orthotopic breast tumors. Cancer research [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2012 Oct 8];70(21):8319–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20837666>

D'Andrea MR, Limiti MR, Bari M, Zambenedetti P, Montagutti A, Ricci F, et al. Correlation between genetic and biological aspects in primary non-metastatic breast cancers and corresponding synchronous axillary lymph node metastasis. Breast cancer research and treatment [Internet]. 2007 Mar [cited 2012 Oct 8];101(3):279–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16835704>

Dekker P, Gunn D, McBryan T, Dirks RW, van Heemst D, Lim F-L, et al. “microarray”-based identification of age-dependent differences in gene expression of human dermal fibroblasts. Mechanisms of ageing and development [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012 Jul [cited 2012 Oct 8];133(7):498–507. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22721680>

Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. Nature [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Apr 15 [cited 2012 Oct 4];464(7291):999–1005. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08989>

Eynden GV den, Colpaert C. A fibrotic focus is a prognostic factor and a surrogate marker for hypoxia and (lymph) angiogenesis in breast cancer: review of the literature and proposal on the criteria. Histopathology [Internet]. 2007 [cited 2012 Sep 28];51:440–51. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2559.2007.02761.x/full>

Falck A-K, Fernö M, Bendahl P-O, Rydén L. Does analysis of biomarkers in tumor cells in lymph node metastases give additional prognostic information in primary breast cancer? World journal of surgery [Internet]. 2010 Jul [cited 2010 Nov 18];34(7):1434–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20213203>

Fan J, Robert C, Jang Y-Y, Liu H, Sharkis S, Baylin SB, et al. Human induced pluripotent cells resemble embryonic stem cells demonstrating enhanced levels of DNA repair and efficacy of nonhomologous end-joining. Mutation research [Internet]. Elsevier B.V.; 2011 Aug 1 [cited 2011 Aug 5];713(1-2):8–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21718709>

Feng Y, Sun B, Li X, Zhang L, Niu Y, Xiao C, et al. Differentially expressed genes between primary cancer and paired lymph node metastases predict clinical outcome of node-positive breast cancer patients. Breast cancer research and treatment [Internet]. 2007 Jul [cited 2010 Oct 8];103(3):319–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17123152>

Fierro F, Sierralta W. Marrow-derived mesenchymal stem cells: role in epithelial tumor cell determination. Clinical and Experimental ... [Internet]. 2004 [cited 2012 Oct 9];21:313–9. Available from: <http://www.springerlink.com/index/WGJ253V377L51576.pdf>

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic Factors in Breast Cancer College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Archives of Pathology*. 1999;124:966–78.

Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. Classifying collective cancer cell invasion. *Nature cell biology* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 Aug [cited 2012 Oct 4];14(8):777–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22854810>

Golomb L, Bublik DR, Wilder S, Nevo R, Kiss V, Grabusic K, et al. Importin 7 and exportin 1 link c-Myc and p53 to regulation of ribosomal biogenesis. *Molecular cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 Jan 27 [cited 2012 Oct 4];45(2):222–32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3270374&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Gutwein LG, Al-Quran SZ, Fernando S, Fletcher BS, Copeland EM, Grobmyer SR. Tumor endothelial marker 8 expression in triple-negative breast cancer. *Anticancer research* [Internet]. 2011 Oct;31(10):3417–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21965755>

Guyot R, Vincent S, Bertin J, Samarut J, Ravel-Chapuis P. The transforming acidic coiled coil (TACC1) protein modulates the transcriptional activity of the nuclear receptors TR and RAR. *BMC molecular biology* [Internet]. 2010 Jan;11:3. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2822774&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Mar 4 [cited 2012 Oct 4];144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Haniffa M A, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* [Internet]. 2009 Feb [cited 2012 Oct 8];94(2):258–63. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2635401&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Hasebe T, Sasaki S. Proliferative activity of intratumoral fibroblasts is closely correlated with lymph node and distant organ metastases of invasive ductal carcinoma of the breast. *The American journal of ...* [Internet]. 2000 [cited 2012 Oct 9];156(5):1701–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1876908/>

Hellingman C A, Koevoet W, Kops N, Farrell E, Jahr H, Liu W, et al. Fibroblast growth factor receptors in in vitro and in vivo chondrogenesis: relating tissue engineering using adult mesenchymal stem cells to embryonic development. Tissue engineering. Part A [Internet]. 2010 Feb;16(2):545–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19728793>

Hwang W, Kim T, Ramanathan M, Zhang A. Bridging centrality: graph mining from element level to group level. Proceeding of the 14th ACM SIGKDD international conference on Knowledge discovery and data mining - KDD '08 [Internet]. New York, New York, USA: ACM Press; 2008. p. 336–44. Available from: http://www.stanford.edu/~thkim7/papers/2008_Bridging.pdf

Hwang Y-C, Lu T-Y, Huang D-Y, Kuo Y-S, Kao C-F, Yeh N-H, et al. NOLC1, an enhancer of nasopharyngeal carcinoma progression, is essential for TP53 to regulate MDM2 expression. The American journal of pathology [Internet]. 2009 Jul [cited 2012 Oct 8];175(1):342–54. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2708820&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Jay P, Bergé-Lefranc JL, Marsollier C, Méjean C, Taviaux S, Berta P. The human growth factor-inducible immediate early gene, CYR61, maps to chromosome 1p. Oncogene [Internet]. 1997 Apr 10;14(14):1753–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9135077>

Jiang L, Gonda T a, Gamble MV, Salas M, Seshan V, Tu S, et al. Global hypomethylation of genomic DNA in cancer-associated myofibroblasts. Cancer research [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2011 Jul 12];68(23):9900–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2670548&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Joo H-Y, Zhai L, Yang C, Nie S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. Regulation of cell cycle progression and gene expression by H2A deubiquitination. Nature [Internet]. 2007 Oct 25 [cited 2012 Oct 8];449(7165):1068–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914355>

Joyce J A, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. Nature reviews. Cancer [Internet]. 2009 Apr;9(4):239–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279573>

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. Nature reviews. Cancer [Internet]. Nature Publishing Group; 2006 May [cited 2012 Oct 5];6(5):392–401. Available from: <http://www.nature.com/nrc/journal/vaop/ncurrent/full/nrc1877.html>

Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* [Internet]. 2007 Oct 4 [cited 2012 Oct 4];449(7162):557–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914389>

Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A, et al. Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PloS one* [Internet]. 2012 Jan [cited 2012 Mar 16];7(2):e30563. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3282707&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Kim JH, Kang H-S, Kim TW, Kim SJ. Differential methylation hybridization profiling identifies involvement of STAT1-mediated pathways in breast cancer. *International journal of oncology* [Internet]. 2011 Oct [cited 2012 Oct 9];39(4):955–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674123>

Koro K, Parkin S, Pohorelic B, Yang A-D, Narendran A, Egan C, et al. Interactions between breast cancer cells and bone marrow derived cells in vitro define a role for osteopontin in affecting breast cancer cell migration. *Breast cancer research and treatment* [Internet]. 2011 Feb [cited 2012 Oct 9];126(1):73–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20401631>

Kuefner M A, Schwelberger HG, Hahn EG, Raithel M. Decreased histamine catabolism in the colonic mucosa of patients with colonic adenoma. *Digestive diseases and sciences* [Internet]. 2008 Mar [cited 2011 Nov 30];53(2):436–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562176>

Kurz T, Ozlü N, Rudolf F, O'Rourke SM, Luke B, Hofmann K, et al. The conserved protein DCN-1/Dcn1p is required for cullin neddylation in *C. elegans* and *S. cerevisiae*. *Nature* [Internet]. 2005 Jun 30 [cited 2012 Oct 9];435(7046):1257–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15988528>

Lai W-T, Krishnappa V, Phinney DG. Fibroblast growth factor 2 (Fgf2) inhibits differentiation of mesenchymal stem cells by inducing Twist2 and Spry4, blocking extracellular regulated kinase activation, and altering Fgf receptor expression levels. *Stem cells (Dayton, Ohio)* [Internet]. 2011 Jul [cited 2012 Oct 9];29(7):1102–11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3410557&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Langsenlehner U**, Renner W, Yazdani-Biuki B, Eder T, Wascher TC, Paulweber B, et al. Integrin alpha-2 and beta-3 gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast cancer research and treatment* [Internet]. 2006 May [cited 2012 Oct 8];97(1):67–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16317580>
- Liu S**, Shi-wen X, Blumbach K. Expression of integrin beta 1 by fibroblasts is required for tissue repair in vivo. *Journal of Cell ...* [Internet]. 2010 [cited 2012 Sep 28];123:3674–82. Available from: <http://jcs.biologists.org/content/123/21/3674.short>
- Livak KJ**, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (San Diego, Calif.) [Internet]. Elsevier; 2001 Dec [cited 2012 Oct 3];25(4):402–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202301912629>
- Magnusson PU**, Dimberg A, Mellberg S, Lukinius A, Claesson-Welsh L. FGFR-1 regulates angiogenesis through cytokines interleukin-4 and pleiotrophin. *Blood* [Internet]. 2007 Dec 15 [cited 2012 Oct 8];110(13):4214–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875810>
- Maragakis NJ**, Dietrich J, Wong V, Xue H, Mayer-Proschel M, Rao MS, et al. Glutamate transporter expression and function in human glial progenitors. *Glia* [Internet]. 2004 Jan 15 [cited 2012 Oct 8];45(2):133–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14730707>
- Martinez-Outschoorn UE**, Casey T, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Zhou J, et al. Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: Role of hypoxia, HIF1 induction and NFkB activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle* [Internet]. 2010 Sep 1 [cited 2012 Oct 9];9(17):3515–33. Available from: <http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/12928/>
- Micalizzi DS**, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* [Internet]. 2010 Jun [cited 2012 Jul 16];15(2):117–34. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2886089&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Milani C**. Expressão gênica diferencial das células estromais obtidas de medula óssea na presença ou ausência de célula tumoral oculta em pacientes com câncer de mama. *Oncologia. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo*; 2006. p. 87.

Ministério da Saúde do Brasil. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA. Ministério de Saúde do Brasil. Rio de Janeiro; 2011 p. 118. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>

Nagai R, Suzuki T, Aizawa K, Shindo T, Manabe I. Significance of the transcription factor KLF5 in cardiovascular remodeling. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* [Internet]. 2005 Aug;3(8):1569–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102021>

Nguyen N, Kuliopulos A, Graham R a, Covic L. Tumor-derived Cyr61(CCN1) promotes stromal matrix metalloproteinase-1 production and protease-activated receptor 1-dependent migration of breast cancer cells. *Cancer research* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2011 Oct 5];66(5):2658–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16510585>

O’Connell JT, Sugimoto H, Cooke VG, MacDonald BA, Mehta AI, LeBleu VS, et al. VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2011 Sep 20 [cited 2012 Oct 8];108(38):16002–7. Available from: <http://www.pnas.org/content/108/38/16002.short>

Olsen CJ, Moreira J, Lukanidin EM, Ambartsumian NS. Human mammary fibroblasts stimulate invasion of breast cancer cells in a three-dimensional culture and increase stroma development in mouse xenografts. *BMC cancer* [Internet]. 2010 Jan;10:444. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2933628&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Ono Y, Sensui H, Okutsu S, Nagatomi R. Notch2 negatively regulates myofibroblastic differentiation of myoblasts. *Journal of cellular physiology* [Internet]. 2007 Feb [cited 2012 Oct 9];210(2):358–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17044085>

Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur C a, Coulier F, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 1996 Jun 21;271(25):15292–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2080618&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Patocs A, Zhang L, Xu Y. Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *The New England journal of medicine* [Internet]. 2007 [cited 2012 Sep 28];357(25):2543–51. Available from: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa071825>

Peset I, Vernos I. The TACC proteins: TACC-ling microtubule dynamics and centrosome function. Trends in cell biology [Internet]. 2008 Aug [cited 2012 Oct 8];18(8):379–88. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18656360>

Polyak K, HU M. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. European journal of cancer (Oxford, England : 1990) [Internet]. 2008 [cited 2010 Oct 20];44(18):2760–5. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:NIH+Public+Access#5>

Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SSW, Takashi S, et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. Cancer cell [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Feb 15 [cited 2011 Jul 19];19(2):257–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3060401&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Rabut G, Peter M. Function and regulation of protein neddylation. “Protein modifications: beyond the usual suspects” review series. EMBO reports [Internet]. 2008 Oct [cited 2012 Oct 4];9(10):969–76. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2572130&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Radisky DC, Kenny P a, Bissell MJ. Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? Journal of cellular biochemistry [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2012 Oct 8];101(4):830–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2838476&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. PLoS genetics [Internet]. 2006 Jul [cited 2011 Jun 22];2(7):e119. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1523235&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Rozenchan PB, Carraro DM, Brentani H, de Carvalho Mota LD, Bastos EP, e Ferreira EN, et al. Reciprocal changes in gene expression profiles of cocultured breast epithelial cells and primary fibroblasts. International journal of cancer. Journal international du cancer [Internet]. 2009 Dec [cited 2010 Jul 1];125(12):2767–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19530251>

- Saeed H**, Taipaleenmäki H, Aldahmash AM, Abdallah BM, Kassem M. Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF) Exhibit a Similar but not Identical Phenotype to Bone Marrow Stromal Stem Cells (BMSC). *Stem cell reviews* [Internet]. 2011 Sep 17 [cited 2011 Nov 1]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21927803>
- Santos RPC**, Benvenuti TT, Honda ST, Del Valle PR, Katayama MLH, Brentani HP, et al. Influence of the interaction between nodal fibroblast and breast cancer cells on gene expression. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* [Internet]. 2011 Feb [cited 2012 Oct 8];32(1):145–57. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3003151&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sarkar A A**, Zohn IE. Hectd1 regulates intracellular localization and secretion of Hsp90 to control cellular behavior of the cranial mesenchyme. *The Journal of cell biology* [Internet]. 2012 Mar 19 [cited 2012 Oct 8];196(6):789–800. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3308699&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schiffman SC**, McMasters KM, Scoggins CR, Martin RC, Chagpar AB. Lymph node ratio: a proposed refinement of current axillary staging in breast cancer patients. *Journal of the American College of Surgeons* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Jul [cited 2012 Oct 8];213(1):45–52; discussion 52–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21601490>
- Scott RW**, Hooper S, Crighton D, Li A, König I, Munro J, et al. LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells. *The Journal of cell biology* [Internet]. 2010 Oct [cited 2010 Oct 7];191(1):169–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876278>
- Sloan EK**, Ciocca DR, Pouliot N, Natoli A, Restall C, Henderson M a, et al. Stromal cell expression of caveolin-1 predicts outcome in breast cancer. *The American journal of pathology* [Internet]. 2009 Jun [cited 2012 Oct 8];174(6):2035–43. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2684169&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sriuranpong V**, Borges MW, Ravi RK, Arnold DR, Nelkin BD, Baylin SB, et al. Notch Signaling Induces Cell Cycle Arrest in Small Cell Lung Cancer Cells
Notch Signaling Induces Cell Cycle Arrest in Small Cell Lung Cancer Cells 1.

Cancer Research [Internet]. 2001;61:3200–5. Available from:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/7/3200>

Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. Nature medicine [Internet]. 2006 Aug;12(8):895–904. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16892035>

Studebaker AW, Storci G, Werbeck JL, Sansone P, Sasser a K, Tavorari S, et al. Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner. Cancer research [Internet]. 2008 Nov [cited 2010 Oct 7];68(21):9087–95. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18974155>

Tamura D, Hiraga T, Myoui A, Yoshikawa H, Yoneda T. Cadherin-11-mediated interactions with bone marrow stromal/osteoblastic cells support selective colonization of breast cancer cells in bone. International journal of oncology [Internet]. 2008 Jul;33(1):17–24. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18575746>

Trimboli AJ, Cantemir-Stone CZ, Li F, Wallace J a, Merchant A, Creasap N, et al. Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. Nature [Internet]. 2009 Oct 22 [cited 2012 Jul 18];461(7267):1084–91. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2767301&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Vaughan KT, Mikami a, Paschal BM, Holzbaur EL, Hughes SM, Echeverri CJ, et al. Multiple mouse chromosomal loci for dynein-based motility. Genomics [Internet]. 1996 Aug 15;36(1):29–38. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8812413>

Veer L van't, Dai H, Vijver MVD. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. nature [Internet]. 2002 [cited 2012 Sep 28];415(345). Available from:
<http://www.nature.com/nature/journal/v415/n6871/abs/415530a.html>

Wang H-T, Kong J-P, Ding F, Wang X-Q, Wang M-R, Liu L-X, et al. Analysis of gene expression profile induced by EMP-1 in esophageal cancer cells using cDNA “microarray”. World journal of gastroenterology : WJG [Internet]. 2003 Mar;9(3):392–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12632483>

Wang J, Kudoh J, Takayanagi A, Shimizu N. Novel human BTB/POZ domain-containing zinc finger protein ZNF295 is directly associated with

ZFP161. Biochemical and biophysical research communications [Internet]. 2005 Feb 11 [cited 2012 Oct 8];327(2):615–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15629158>

Weber A, Kristiansen I, Johannsen M, Oelrich B, Scholmann K, Gunia S, et al. The FUSE binding proteins FBP1 and FBP3 are potential c-myc regulators in renal, but not in prostate and bladder cancer. BMC cancer [Internet]. 2008 Jan [cited 2012 Oct 8];8:369. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2631590&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Wei Q, Adelstein RS. Conditional expression of a truncated fragment of nonmuscle myosin II-A alters cell shape but not cytokinesis in HeLa cells. Molecular biology of the cell [Internet]. 2000 Oct;11(10):3617–27. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15019&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Weis SM, Cheresh D a. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. Nature medicine [Internet]. Nature Publishing Group; 2011 Jan [cited 2012 Oct 8];17(11):1359–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064426>

Werner E, Kowalczyk AP, Faundez V. Anthrax toxin receptor 1/tumor endothelium marker 8 mediates cell spreading by coupling extracellular ligands to the actin cytoskeleton. The Journal of biological chemistry [Internet]. 2006 Aug 11 [cited 2012 Oct 8];281(32):23227–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16762926>

Woelfle U, Cloos J, Sauter G, Riethdorf L. Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. Cancer research [Internet]. 2003 [cited 2012 Sep 28];63:5679 –5684. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/18/5679.short>

Wu X, Kodama A, Fuchs E. ACF7 regulates cytoskeletal-focal adhesion dynamics and migration and has ATPase activity. Cell [Internet]. 2008 Oct 3 [cited 2012 Oct 8];135(1):137–48. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2703712&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Xiao Q, Ge G. Lysyl Oxidase, Extracellular Matrix Remodeling and Cancer Metastasis. Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society [Internet]. 2012 Apr 13 [cited 2012 Oct 8]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528876>

Xu K, Rajagopal S, Klebba I, Dong S, Ji Y, Liu J, et al. The role of fibroblast Tiam1 in tumor cell invasion and metastasis. *Oncogene* [Internet]. 2010 Dec 16 [cited 2012 Oct 9];29(50):6533–42. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2997941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Yoon D-K, Jeong C-H, Jun HO, Chun K-H, Cha J-H, Seo JH, et al. AKAP12 induces apoptotic cell death in human fibrosarcoma cells by regulating CDK1-cyclin D1 and caspase-3 activity. *Cancer letters* [Internet]. 2007 Aug 28 [cited 2012 Oct 8];254(1):111–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442483>

Yu S-J, Yu J-K, Ge W-T, Hu H-G, Yuan Y, Zheng S. SPARCL1, Shp2, MSH2, E-cadherin, p53, ADCY-2 and MAPK are prognosis-related in colorectal cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* [Internet]. 2011 Apr 21 [cited 2012 Oct 8];17(15):2028–36. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3082758&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>