

Patricia Bortman Rozenchan

**Caracterização molecular de fibroblastos originários de
tecido mamário neoplásico ou não e modificação do perfil
gênico após interação com células epiteliais mamárias
normais**

**Tese apresentada ao Departamento de
Radiologia da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani**

**São Paulo
2005**

Para Gilberto, por seu amor, companheirismo e
respeito.

Para Paula, minha mais completa obra, por
cada olhar, cada sorriso que me fazem buscar o
meu melhor a cada dia.

Para minha Helena, minha mãe, você me fez
chegar até aqui através do seu exemplo diário de
perseverança.

Para as mulheres que decidiram, muitas vezes
no momento triste da descoberta da doença,
participar deste trabalho, simplesmente por
acreditar que cada pequeno passo poderá ajudar
a melhorar a vida de outras mulheres.

Agradecimentos

À Prof^a Dr^a Maria Mitzi Brentani por sua orientação sempre presente, pela oportunidade de me fazer vivenciar a ciência, contribuindo enormemente para minha formação acadêmica e pessoal. Cada consideração contribuiu para expandir minha própria visão sobre o método científico.

Às Dr^{as} Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira e Maria Lúcia Hirata Katayama pelo constante envolvimento neste trabalho desde seu princípio e acima de tudo, pelo carinho e amizade de sempre.

Aos Drs. Miriam Hatsue Honda Federico e Roger Chammas pelas discussões informais que sempre engradeceram este trabalho.

À Dr^a Shigueko Sonohara Pueyo e à Srta Mara Souza Junqueira pelos ensinamentos referentes ao estabelecimento de cultura primária por explante.

À Dr^a Rosimeire Aparecida Roela pelo auxílio referente à cultura celular, pelas discussões sobre o trabalho e principalmente pela amizade.

À Dr^a Flávia Regina Rotea Mangone pela ajuda relativa à formatação deste trabalho e pelo convívio traduzido na palavra amizade.

À Srta Tatiana Leonelli de Lourdes por toda sua ajuda e dedicação na parte técnica deste trabalho.

Às Srtas Rosângela Portilho Costa Santos, Cíntia Milani, Ticiane Benvenuti e Lúcia Valéria da Silva Teixeira Machado pelo carinho e colaboração em diversos momentos deste trabalho, exemplificando como um grupo de trabalho deve ser.

Ao Instituto Brasileiro de Controle do Câncer em nome do Dr. Eduardo Carneiro Lyra pela coleta do material biológico utilizado neste trabalho.

Ao Dr. Luiz Fernando Lima Reis e seu grupo, principalmente Dr. Alex Fiorino, do Instituto Ludwig de São Paulo, pela confecção das lâminas de cDNA microarray.

À Dr^a Dirce Maria Carraro, srta Louise Danielle de Carvalho Motta e srta Elen Pereira Bastos do Laboratório de Expressão Gênica do Instituto Ludwig de São Paulo pela colaboração na realização dos ensaios de cDNA microarray.

À Dr^a Helena Brentani e seu grupo do Laboratório de Bioinformática do Instituto Ludwig de São Paulo pela realização das análises estatísticas dos dados de cDNA microarray.

À Sra Maria José Gonçalves Benevides pelo desempenho com que lida com a parte administrativa deste laboratório e ainda pelo carinho constante.

Às amigas Fátima Solange Pasini, Simone Maistro, Cristina Campofiorito e Karen Brunialti pelas discussões informais e pelo carinho sempre presente.

À Maria Cristina Piñero Grandal pelo cuidado com que tratou da parte ilustrativa deste trabalho.

Aos demais amigos do laboratório de Oncologia Experimental por fazer deste um ambiente prazeroso de trabalho.

Ao Dr Benjamim Lebensztajn por me encaminhar na iniciação científica, mostrando-me o caminho do qual não quis mais sair e à Dr^a Nancy Rozenchan pelo seu interesse e estímulo sempre constantes à minha vida acadêmica.

Aos meus irmãos Ricardo e Renato Bortman pelo apoio e interesse e Néelson, Rosilda e Eliana Rozenchan por terem sempre me acolhido tão bem e por seu estímulo ao meu desenvolvimento profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro através do processo nº 13515-01.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A TECNOLOGIA DO “CDNA MICROARRAY”	12
2	OBJETIVOS	14
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	15
3.1	CASUÍSTICA	15
3.1.1	<i>Descrição das Pacientes Recrutadas</i>	15
3.1.2	<i>Critérios de Inclusão</i>	16
3.2	CULTURA DE CÉLULAS	16
3.2.1	<i>Cultura primária de fibroblastos humanos</i>	16
3.2.2	<i>Congelamento de fibroblastos obtidos de cultura primária</i>	17
3.2.3	<i>Cultura de Células Epiteliais Mamárias</i>	17
3.2.4	<i>Co-culturas de fibroblastos e células epiteliais</i>	18
3.3	ENSAIO DE IMUNOCITOQUÍMICA	20
3.4	VERIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	20
3.5	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	21
3.6	CDNA MICROARRAY	22
3.7	PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO DE RNAM.....	23
3.8	HIBRIDIZAÇÃO EM LÂMINAS DE VIDRO	27
3.9	ANÁLISE MATEMÁTICA DOS DADOS	29
4	RESULTADOS	32
4.1	OBTENÇÃO DE BANCO DE CULTURA PRIMÁRIA DE FIBROBLASTOS E CÉLULAS EPITELIAIS MAMÁRIAS.....	32
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA CELULAR DE FIBROBLASTOS.....	34
4.3	CURVA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DE FIBROBLASTOS PROVENIENTES DE LESÕES BENIGNAS E TUMORES MALIGNOS.....	36
4.4	CO-CULTURA SEPARADA POR INSERTOS	37
4.5	CDNA MICROARRAY.....	37
4.5.1	<i>Análise Quantitativa</i>	38
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÕES	56
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

Lista de abreviaturas

β caseína	caseína do tipo beta
μ g	microgramas
μ L	microlitros
μ M	micromolar
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos
DO	densidade ótica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
M	molar
mA	miliAmpere
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NTPs	nucleotídeos tri-fosfato
PBSA	1,5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , azida, pH 7,0
RNA	ácido ribonucléico
Rnase A	ribonuclease A

RNAsin	inibidor de RNA
rpm	rotações por minuto
RPMI	meio de cultura do Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ácido ribonucléico ribossomal
SDS	dodecil sulfato de sódio
SSC	0,15M NaCl; 0,015M citrato de sódio pH 7,0
TE	10mM Tris HCl, 1mM EDTA
TRITC	Isotiocianato de tetrametilrodamina cristalina
UV	luz ultravioleta

Resumo

A homeostase da mama normal depende das interações entre células epiteliais e o estroma a elas associado. Estudos anteriores mostraram que no carcinoma mamário o estroma é constituído por células com diferentes funções. Estes elementos do estroma incluem fibroblastos, os quais modulam o comportamento tumoral, fornecendo fatores de crescimento e componentes de matriz extracelular. Nosso objetivo foi investigar a expressão gênica diferencial entre fibroblastos derivados de tecido mamário neoplásico ou não neoplásico e analisar a influência de células epiteliais normais (MCF10A) no perfil de expressão gênica de fibroblastos obtidos de tecido mamário neoplásico. Culturas primárias de fibroblastos foram estabelecidas e a expressão de vimentina e actina de músculo liso foi positiva. Foi realizada a co-cultura destas células com separação por insertos, o que permite a passagem de fatores solúveis, e o RNA foi extraído. Após a amplificação do RNAm foram sintetizadas sondas de cDNA, as quais foram marcadas com fluorocromos conjugados a deoxinucleotídeo, hibridizadas competitivamente sobre lâminas de vidro contendo 4.608 ORESTES criadas no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer/FAPESP e os sinais fluorescente gerados foram quantificados. Após a normalização destes dados, os genes diferencialmente expressos, com *False Discovery Ratio* (FDR) menor que 0,05, foram selecionados para análises posteriores. Encontramos 283 genes diferencialmente expressos em fibroblastos derivados de tecido mamário neoplásico quando comparados àqueles derivados de tecido mamário não-neoplásico. Dentre estes genes, 187 foram

quantitativamente regulados negativamente (com variação de expressão de 1,05 a 4,14) contra 96 regulados positivamente (variação de expressão de 1,17 a 7,73). A maioria destas alterações foram relacionadas ao transporte entre membranas, transdução de sinal e biosíntese. Estes resultados podem sugerir uma redução na expressão gênica durante o processo de transformação. Após a co-cultura com células MCF10A, encontramos 566 genes diferencialmente expressos nos fibroblastos derivados de tecido mamário neoplásico, 323 foram regulados negativamente (expressão variando de 1,09 a 10,62) e 243 regulados positivamente (variação de expressão de 1,03 a 16,62). A influência das células MCF10A na expressão gênica destes fibroblastos pôde ser vista através da desregulação da expressão de genes relacionados com a proliferação celular, adesão, apoptose e sobrevivência.

SUMMARY

The homeostasis of normal breast depends on interactions between epithelial cells and their associated stroma. Previous studies indicated that in breast cancer carcinoma, tumor associated stromal cells with different functions appear to be emerged. These stromal elements include fibroblasts which modulate tumor behavior providing various growth factors and extracellular matrix components. Our aim was to evaluate the differential gene expression between fibroblasts derived from mammary tissue neoplastic or not and to analyze the influence of normal epithelial cells (MCF10A) on gene expression profile of fibroblasts obtained from neoplastic mammary tissue. Fibroblast primary cultures were established and expression of vimentin and smooth cell actin was positive. Co-culture of these cell types separated by inserts, which allow the passage of soluble factors, was done and total RNA was extracted. After mRNA amplification using a template-switching prime, cDNA probes were synthesized, labeled with fluorochrome conjugated deoxynucleotide, a competitive hybridization was undertaken onto cDNA microarray glass slides in which 4,608 ORESTES (open reading frame expressed sequence tags) from Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer/FAPESP bank were spotted and fluorescent signals were quantified. After normalization, the differentially expressed genes, at a False Discovery Ratio (FDR) less than 0.05, were selected for further analysis. We found 283 differentially expressed genes in fibroblasts obtained from neoplastic mammary tissue when compared with non neoplastic derived fibroblasts. Among these genes, 187 were quantitatively down regulated (fold ranging

from 1.05 to 4.14) against 96 up regulated (fold ranging from 1.17 to 7.73). The majority of alterations were related to membrane transport, signaling transduction and biosynthesis. Overall these results could suggest a reduced gene expression along transformation process After coculture with MCF10A cells, we found 566 differentially expressed genes in neoplastic mammary tissue derived fibroblasts, 323 were down regulated (fold ranging from 1.09 to 10.62) and 243 up regulated (fold ranging from 1.03 to 16.62). MCF10A influence in mammary tissue neoplastic derived fibroblasts gene expression could be seen through the deregulation of expression of some genes possibly related cell proliferation, adhesion, apoptosis and survival.

1 Introdução

O câncer de mama é no mundo todo, incluindo o Brasil, um problema de saúde pública, sendo a primeira causa de morte por câncer nas mulheres em países desenvolvidos. No Brasil, estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA, Ministério da Saúde) indicam que 49.470 casos novos devem ocorrer no ano de 2005.

A carcinogênese é caracterizada por um processo de múltiplos passos, no qual uma série de alterações genéticas ocorre em seqüência, levando as células a perderem seu controle do crescimento celular (Volgestein, Kinzler, 1993). A formação do carcinoma desde seus estágios precoces parece depender também da habilidade de células epiteliais transformadas em recrutar e subverter uma variedade de células estromais originárias do tecido normal adjacente. Assim, o componente estromal parece desenvolver-se conjuntamente com o compartimento epitelial tumoral, contribuindo assim com os efeitos progressivos da doença (Maeda *et al.*, 2004; revisito Elenbaas, Weinberg, 2001). Relata-se também que o estroma pode regular o crescimento e a diferenciação de células cancerígenas de mama (Allinen *et al.*, 2004). Barcelos-Hoff, Ravani, 2000, demonstraram que a irradiação do componente estromal da glândula mamária *in vivo* contribui para a formação de tumores epiteliais. Em um estudo com modelos xenográficos com células MDA-MB 231 relatou-se a presença de atividade enzimática derivada do estroma, diferente daquela encontrada no carcinoma, evidenciando a influência do microambiente nas

propriedades celulares e moleculares das células tumorais (Jessani *et al.*, 2004). Fukino e colaboradores, 2004, relataram que interações dinâmicas entre o epitélio e o estroma em tumores sólidos podem selecionar subgrupos de células estromais com a capacidade de modular o comportamento tumoral e ainda, que o microambiente local promove o surgimento de células estromais associadas ao tumor com funções diferentes daquelas do estroma normal.

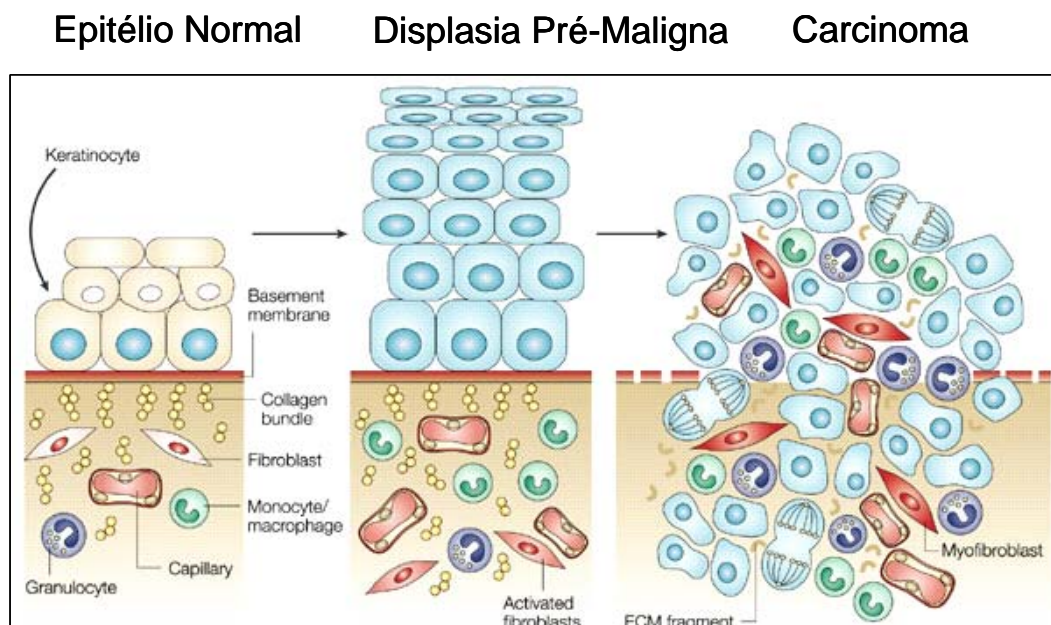


Figura 01: Composição do estroma e alterações estromais durante a progressão tumoral (Mueller, Fusenig, 2004).

Na homeostase do tecido mamário há um equilíbrio mantido por interações dinâmicas entre células epiteliais e o microambiente (Wiseman, Werb, 2002). O estroma normal é composto de colágenos intersticiais ou da membrana basal, fibronectina, laminina e várias proteoglicanas (revisto por Lin, Bissel, 1993). Sua população celular é heterogênea originária, principalmente, do mesênquima e inclui fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais, apresentando freqüentemente infiltração de células

inflamatórias (Dvorak, 1986; van den Hoff, 1988). O estroma fornece suprimento vascular e moléculas solúveis específicas da matriz extracelular necessárias para o crescimento e a progressão tumoral (Figura 01). Este equilíbrio entre células epiteliais e mesênquimais é mantido por três formas de comunicação: a) comunicação extracelular através de fatores solúveis, como hormônios, fatores de crescimento e citosinas; b) comunicação intracelular via segundos mensageiros e transdução do sinal e c) comunicação intercelular através da adesão célula-célula e célula-matriz extracelular.

O tipo estromal predominante na maior parte dos carcinomas é o miofibroblasto (Elenbaas, Weinberg, 2001). Os miofibroblastos associados à neoplasia fornecem ao tumor uma consistência rígida (desmoplasia), graças à formação de colágenos e outras proteínas da matriz extracelular (Deb *et al.*, 2004).

Quando o tumor atinge 200 μ m, a hipóxia celular estimula a produção de fatores que dão origem ao processo de neovascularização. A indução da angiogênese, um processo seqüencial originário das células endoteliais microvasculares, é mediado por múltiplas moléculas que são liberadas tanto pelas células tumorais quanto pelas células estromais. Dentre estas moléculas estão membros da família de fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento vascular endotelial celular (VEGF) ou fator de permeabilidade vascular (VPF), interleucina-8 (IL-8), fator de crescimento de insulina tipo I (IGF I), IGF II, angiogenina, angiotropina, fibrina, nicotinamida, fator de crescimento endotelial derivado de plaqueta (PDGF), fator de

crescimento transformante- α (TGF- α) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Fidler, 1997).

Elenbaas & Weinberg, 2001, descrevem que no caso de câncer de mama, o VEGF é altamente expresso em carcinomas ductais, os quais também apresentam desmoplasia, em contraste aos carcinomas lobulares, os quais mostraram baixa expressão de VEGF e fraca capacidade angiogênica. De modo similar, os receptores de VEGF são bastante expressos em células endoteliais de carcinomas ductais em relação às mesmas células de carcinomas lobulares.

A maior parte destes fatores citados anteriormente, é predominantemente estimuladora de crescimento. Contrariamente, a família do TGF- β age como inibidora de proliferação na maior parte das células epiteliais. Relata-se que células carcinogênicas apresentam altos níveis de TGF- β relacionados com a desmoplasia do tumor. Em câncer de mama, TGF- β 1 é preferencialmente expresso em tumores primários avançados e em metástases de linfonodos, sugerindo seu papel na interação entre as células tumorais e o estroma adjacente. Entretanto, durante a progressão tumoral, as células epiteliais tumorais geralmente adquirem mutações em componentes da via do TGF- β , como os receptores de TGF- β tipo I e II e nas Smads 2 e 4, ou ainda em componentes da via do retinoblastoma (pRB). Ambos grupos de mutações conferem às células tumorais resistência aos efeitos inibitórios de crescimento do TGF- β em diferentes graus. No entanto, a perda de sensibilidade ao TGF- β é freqüentemente acompanhada por aumento da expressão de TGF- β , sendo uma de suas fontes os fibroblastos

estromais (Gold *et al.*, 1999). Estudos recentes demonstraram que, em camundongos, nos quais o gene do receptor de TGF- β tipo II foi inativado em fibroblastos estromais, houve a superexpressão de fator de crescimento de hepatócito (HGF), levando a um aumento na proliferação de células epiteliais que expressavam o receptor de HGF, c-met, em ação parácrina (Bhowmick *et al.*, 2004).

Outro aspecto a ser considerado na progressão tumoral diz respeito à interação de células tumorais com células estromais ou com a matriz extracelular, uma vez que o compartimento estromal da glândula mamária normal e do tumor desempenha um importante papel quanto a alterações funcionais e proliferativas no epitélio (Haslam, Woodward, 2003). Parte destas interações é mediada por receptores de superfície da família das integrinas, as quais são heterodímeros compostos por uma cadeia α e uma β . Estes heterodímeros $\alpha\beta$ interagem com seus ligantes extracelulares assim como com o citoesqueleto intracelular e têm função de molécula de adesão. As integrinas podem também ativar vias de sinalização intracelular as quais regulam o crescimento, a diferenciação, a mobilidade celular e a expressão gênica. As células epiteliais mamárias expressam basicamente integrinas $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta1$ e $\alpha6\beta4$ e as células cancerosas podem apresentar alterações do padrão de expressão destas moléculas de adesão (revisto por Shaw, 1999). Outras moléculas da matriz extracelular foram descritas anteriormente como tendo sua expressão aumentada em câncer de mama, a saber, colágeno tipo I, fibronectina, trombospondina e decorina (Mueller,

Fusenig, 2004), indicando alterações relacionadas à membrana basal neste tipo de tumor.

A interação entre células epiteliais tumorais e fibroblastos cria um contexto que promove migração e invasão. Para que as células tumorais originem metástases precisam invadir, degradar a matriz extracelular, entrar na circulação, sobreviver, extravasar e crescer. Para tanto, utiliza-se de diferentes proteases que são importantes nestes processos, como as serina-proteases. O sistema ativador de plasminogênio tipo uroquinase compreende pelo menos quatro proteínas: ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA), seu receptor ligado a membrana (uPAR) e dois inibidores de ativação de plasminogênio (PAI-1 e PAI-2) (revisto por Look, Foekens, 1999). Verificou-se que a fonte fundamental de uPA são as células estromais, fundamentalmente fibroblastos (Nielsen, 1996). A expressão do sistema do ativador de plasminogênio nos fibroblastos tem forte associação com o comportamento clínico dos tumores (Dublin *et al.*, 2000). O sistema de uPA é considerado um importante fator prognóstico no câncer de mama (Duffy *et al.*, 1988; Peyrat *et al.*, 1998), embora não haja um consenso sobre qual combinação de seus componentes seja mais informativo. Mostrou-se que altos níveis de uPA, uPAR e PAI-1 relacionaram-se com curta sobrevida livre de recidiva enquanto altos níveis de PAI-2 relacionaram-se a períodos mais longos sem a doença (Solomayer *et al.*, 1997). As metaloproteínases da matriz extracelular (MMPs) constituem outra família de proteases responsáveis pelo remodelamento normal da matriz extracelular. Estas proteínas são expressas tanto pelas células epiteliais tumorais quanto pelo

microambiente estromal, incluindo fibroblastos, células endoteliais e inflamatórias (Menashi *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2003). As MMPs podem ser agrupadas livremente pelo seu domínio estrutural assim como, pela especificidade ao substrato. Trabalhos têm mostrado a relação entre algumas MMPs e câncer de mama, a saber, uma alta porcentagem de cânceres de mama invasivos expressam a estromelina-3 (MMP-11) (Selvey *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 1993; Basset *et al.*, 1990), sendo que a mesma foi também detectada em carcinomas *in situ*, os quais tornam-se freqüentemente tumores invasivos (Wolf *et al.*, 1993). Em carcinomas mamários, assim como em muitos outros tipos de tumores, a expressão gênica da estromelina-3 mostrou-se restrita às células fibroblásticas vizinhas às células neoplásicas (Basset *et al.*, 1990), isto não foi verificado nas próprias células malignas ou em células estromais em sítios distantes do foco tumoral (Rouyer *et al.*, 1994). Wang e cols, 2002, relataram que a expressão de estromelina-3 é induzida apenas após contato com células cancerígenas. A gelatinase A (MMP-2) também é altamente expressa em tumores mamários, entretanto, também pode ser detectada em tecido normal e lesões benignas (Jones *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 2003; Soini *et al.*, 1994; Polette *et al.*, 1994; Polette *et al.*, 1993; Tryggvason *et al.*, 1993; Monteagudo *et al.*, 1990; Basset *et al.*, 1990). Dados do nosso grupo mostraram que houve maior expressão de RNAm de estromelina 3, gelatinase A e matrilina em carcinomas em relação ao tecido mamário normal adjacente. Observou-se ainda que altos níveis de expressão de RNAm de gelatinase A e B foram inversamente correlacionados com a

sobrevida global dos pacientes (Pacheco *et al.*, 1998, 2001). Em outro trabalho, no qual determinou-se a expressão gênica de MMP-2 e gelatinase B (MMP-9) após co-cultura de fibroblastos derivados de tumor de mama e células epiteliais mamárias, relata-se que a expressão de MMP-2 está presente no estroma de tumores malignos e é aumentada através de estimulação parácrina, mediada por fatores solúveis. Por outro lado, a expressão de MMP-9 em fibroblastos derivados de tumores mamários requer contato direto com epitélio tumoral maligno (Singer *et al.*, 2002). Além disso, relata-se que fibroblastos podem regular a invasão de células epiteliais mamárias tumorais por produzir MMP-9 através de trombospondina-1 (TSP-1) (Wang *et al.*, 2002). Ainda mostrando a importância da interação célula epitelial/estroma, Bisson e colaboradores, 2003, mostraram que fibroblastos derivados de tumor de mama mostraram expressão elevada de metaloproteinase de matriz tipo I de membrana (MT1-MMP), a qual ativa MMP-2 e MMP-13, em relação a fibroblastos derivados de mama normal.

Pelo exposto denota-se que inúmeras interações regulatórias entre células malignas e o microambiente celular que as circunda ocorrem em vários tipos de tumores, incluindo o de mama. Os mecanismos pelos quais as interações célula/matriz extracelular influenciam o comportamento metastático de células tumorais são variados e incluem: alterações glicoproteicas da composição da matriz extracelular, o que pode alterar a adesão e a mobilidade celular; aumento da atividade de proteinases que degradam a matriz extracelular, o que presumivelmente facilita a

movimentação de células tumorigênicas por ruptura da membrana basal e do compartimento estromal; e liberação de fragmentos bioativos da matriz extracelular e/ou de fatores de crescimento que promovem a progressão tumoral (Bemis, Schedin, 2000).

Estudos acerca destas interações funcionais utilizando co-culturas mostram resultados controversos. Dong-Le Bourhis e cols. (1997) relatam que fibroblastos oriundos de tecido mamário normal inibem a proliferação de células de câncer de mama MCF-7, mas não o de células mamárias imortalizadas e que fibroblastos obtidos de tecido mamário canceroso não influenciam a proliferação destas duas linhagens epiteliais mamárias. Por outro lado, Shekhar e cols. (2001) mostraram que fibroblastos derivados de tecido mamário normal oriundo de mamoplastia inibem o crescimento de linhagens epiteliais mamárias normais, enquanto fibroblastos provenientes de câncer de mama induzem o seu crescimento. Lefebvre e cols. (1995), demonstraram uma maior proliferação de linhagens de câncer de mama co-cultivadas com fibroblastos originários de câncer de mama, mas o mesmo não ocorreu com células epiteliais mamárias normais. De maneira similar, Gache e cols. (1999), mostraram que fibroblastos derivados de tecido mamário normal estimularam o crescimento de células epiteliais normais e tumorais. Nestes trabalhos, algumas diferenças relativas ao modo de co-cultura podem, em parte, ter originado estas divergências. Enquanto Dong-Le Bourhis e cols. (1997) e Gache e cols. (1999) cultivaram os fibroblastos e as células epiteliais separados por membrana porosa, que permite a passagem de substâncias solúveis, mas elimina o contato direto entre elas,

Shekhar e cols. (2001) e Lefebvre e cols. (1995) cultivaram as células em íntimo contato.

Outros autores observaram que quando a co-cultura foi realizada em 3 dimensões, somente algumas linhagens de câncer de mama mostraram capacidade de invadir o esferóide de fibroblastos, independente deste último ser originário de tecido normal ou canceroso. Demonstrou-se também que fibroblastos normais co-cultivados com células epiteliais tumorais BT474, apresentam menor expressão de RNAm de PMP22, que codifica uma proteína cuja expressão em fibroblastos, correlaciona-se a parada de proliferação em G0. Esta foi identificada como a primeira molécula com papel potencial na interação heteróloga entre células tumorais e fibroblastos normais (Kunz-Schughart *et. al.*, 2001). Ainda utilizando o modelo de co-cultura tridimensional, verificou-se que as linhagens celulares tumorais podiam invadir a camada de fibroblastos adjacente e ainda que a capacidade de migrar relacionava-se com o potencial invasivo das células cancerígenas e o tipo de fibroblastos utilizados, as populações não-invasivas não apresentaram essa característica. Deste modo, das linhagens utilizadas, as células MDA-MB-231 e, em menor grau, HDQ-P1, mostraram-se invasivas, e essa invasão foi mais profunda quando o fibroblasto utilizado na co-cultura era derivado de tumor (Wang et al., 2001). Em outro trabalho utilizando o modelo de co-cultura tridimensional, relatou-se um mecanismo regulatório entre células epiteliais mamárias tumorais e fibroblastos, uma vez que identificaram a supressão de expressão de RNA mensageiro de receptor

de quinase C ativada tipo 1 (Rack 1) após a interação das células epiteliais com fibroblastos (Seidl, 2002).

Em um modelo *in vivo*, Camps e cols. (1990) relatam que fibroblastos tumorigênicos de rato, NbF-1, co-inoculados com células epiteliais, entre elas células de câncer de mama humano MDA-436, em camundongos imunossuprimidos, levam à formação de tumores, o que não acontece quando as células epiteliais são injetadas isoladamente. Aparentemente, fatores do hospedeiro também interferem com esta relação entre células epiteliais e fibroblastos para determinar a formação de tumores.

Darcy e cols, 2000, utilizando um sistema de co-cultura com membrana separando os dois tipos celulares, mostraram a relevância da interação epitélio-estroma, uma vez que verificaram que fibroblastos derivados de mama estimulam o crescimento, a morfogênese alveolar e a diferenciação funcional de células mamárias epiteliais normais de rato.

Em resumo, o papel dos fibroblastos no crescimento e progressão tumoral ainda é controverso. Segundo Rossi e cols, 2000, os fibroblastos podem afetar o crescimento de células transformadas, inibindo sua proliferação, a indução de diferenciação e/ou apoptose, dependendo da célula em questão. Em contrapartida, fibroblastos do estroma pioram o comportamento maligno de células epiteliais e estão envolvidos na perda de integridade epitelial durante o processo neoplásico.

Nestes processos, várias moléculas parecem envolvidas nesta interação entre estes diferentes tipos celulares e alguns estudos abordaram a expressão de algumas delas separadamente, mas uma visão global da

expressão gênica nos fibroblastos derivados de tecido mamário não neoplásico e neoplásico ainda não foi relatada.

1.1 A tecnologia do “cDNA microarray”

Embora grandes deleções e alterações em genes específicos estejam implicadas na progressão do câncer de mama, um melhor entendimento das bases moleculares desta doença foi o resultado de estudos que permitam a avaliação de padrões globais de expressão gênica (Nathanson *et al.*, 2001; Monni *et al.*, 2001). A utilização da metodologia dos “cDNA microarrays” permite o monitoramento do nível de expressão de milhares de genes simultaneamente utilizando o RNA extraído a partir de tumores primários ou de linhagens celulares. A vantagem desta metodologia é a de que uma vez que as características de um tumor são determinadas pela expressão de milhares de genes, é possível identificar grupos de genes cujo padrão de expressão é capaz de prever o comportamento biológico de tumores individuais. O nível de expressão relativa de todos os genes testados dentro de uma mesma amostra constitui o seu “perfil de expressão gênica”, que pode ser então comparado com os perfis obtidos a partir de outras amostras.

De forma simplificada, os cDNAs de interesse (ou parte deles) são imobilizados em uma lâmina de vidro de forma ordenada, originando o chamado cDNA microarray. Na etapa seguinte, a lâmina de vidro é hibridizada simultaneamente com duas populações de cDNAs marcadas com fluorocromos de cores diferentes (por exemplo: vermelho para a amostra tumoral e verde para a amostra controle). Aqueles transcritos que

possuem homologia com seqüências fixadas à lâmina de vidro se ligarão ao microarray e a razão entre as intensidades dos diferentes fluorocromos (vermelho/verde) em cada ponto indicará a expressão relativa do gene dentro da população de mensageiros do tumor ou da célula controle. A utilização de lâminas de vidro como o suporte sólido para a fixação do painel de genes a ser estudado possui vantagens sobre as membranas de nylon, pois reduz a área de difusão necessária para que a sonda encontre as seqüências alvo, reduzindo assim o volume necessário para a hibridização. Como resultado, uma menor quantidade de RNA das amostras em estudo é necessária, tornando possível o estudo de material de biópsia (Duggan *et al.*, 1999). Os cDNA microarrays podem ser diferentes quanto ao tamanho dos fragmentos de DNA fixados, métodos de arranjo, ligações existentes entre o DNA e o suporte, métodos de hibridização e detecção. Os formatos mais conhecidos para os microarrays que usam a lâmina de vidro como o suporte sólido são o arranjo de cDNAs e o arranjo de oligonucleotídeos sintetizados *in situ* (Cheung *et al.*, 1999). A utilização de "cDNA microarray" para análise da expressão gênica possui diversas outras aplicações. Eles podem ser utilizados para o monitoramento de genes sabidamente expressos em determinada situação, na descoberta de genes que são relevantes em uma doença ou via metabólica, ou na determinação da expressão gênica tecido-específica.

2 Objetivos

1. Estabelecer cultura primária de fibroblastos provenientes de tecido mamário com ou sem neoplasia e avaliar a proliferação destas células.
 2. Determinar a expressão gênica diferencial entre os dois tipos de fibroblastos obtidos.
 3. Comparar a expressão diferencial de genes, em ensaios de microarray, dos fibroblastos quando mantidos em cultura isoladamente ou quando co-cultivados com células epiteliais.
-

3 Casuística e Métodos

3.1 Casuística

Tecido mamário tumoral e benigno proveniente de pacientes com câncer de mama ou alterações benignas de mama submetidas a cirurgia foram doados pelo Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), sendo o Dr. Eduardo Carneiro Lyra o responsável pela coleta do material biológico, após consentimento informado das pacientes. Esta coleta realizou-se no período de 18/04/02 a 12/08/04. A classificação para estadiamento clínico utilizada baseou-se no critério TNM.

3.1.1 Descrição das Pacientes Recrutadas

	Identificação	Idade	Estadiamento
Benignos	Tia	24	Fibroadenoma
	Pas	31	Fibroadenoma
	Sef	37	Fibroadenoma
	Luc	44	Fibroadenoma
	Fat	46	Hiperplasia ductal
Tumoral	Rai	79	EC II
	Ed	52	EC II
	Ig	68	Tis, pN0
	Ivo	46	EC I
	Fran	44	EC II
	Mit	50	EC I
	Angel	54	EC II
	Das	63	EC III

ECII – Estadiamento clínico II

3.1.2 Critérios de Inclusão

Todas as pacientes foram utilizadas para a montagem do banco de cultura primária de fibroblastos. Já para realização dos ensaios, selecionamos as 04 pacientes com o mesmo estadiamento clínico (EC II) e 04 pacientes consideradas como controle, a saber, 3 com fibroadenoma e 1 com hiperplasia ductal.

3.2 Cultura de células

3.2.1 Cultura primária de fibroblastos humanos

Fibroblastos obtidos de tecido mamário neoplásico ou não foram mantidos em cultura. Em resumo, após remoção cirúrgica, o fragmento de tecido foi colocado em garrafa estéril de cultura celular, contendo meio com antibióticos e através de dissecções foi retirado qualquer eventual sobra de tecido adiposo. Assim obtiveram-se fragmentos menores do tecido, os quais foram lavados duas vezes em solução fisiológica e distribuídos em garrafas de cultura celular de 25 cm² contendo meio de cultura Dulbecco's (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA), acrescido de 20% de soro fetal bovino, 100 mg/mL de ampicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B. Os explantes foram mantidos nestas condições até que os fibroblastos começaram a sair e tornaram-se confluentes. A partir deste momento, os fragmentos de tecido foram cuidadosamente removidos e após a confluência total da garrafa, os fibroblastos foram tripsinizados e subcultivados em outras garrafas, esta etapa foi considerada como

passagem 1 e para os ensaios foram utilizados fibroblastos entre as passagens 3 e 15.

3.2.2 Congelamento de fibroblastos obtidos de cultura

primária

Após o estabelecimento de uma cultura homogênea de fibroblastos, a partir da terceira passagem, iniciamos a montagem de um banco de congelamento para estas células. Foi realizada a contagem e verificação da viabilidade celular destes fibroblastos pelo método de exclusão de azul tripan (0,02%) e um total de 1×10^6 células, com viabilidade acima de 95%, foram congeladas usando-se a seguinte solução para cada ampola de 2mL: 95% de soro fetal bovino e 5% de DMSO (Dimetil-sulfóxido, SIGMA, Saint Louis, USA). Estas ampolas foram estocadas por 24 horas em sistema para congelamento Nalgene™ Cryo (Nalgene Inc, USA) em freezer a -70°C e depois transferidas para um container de nitrogênio líquido, onde permaneceram até o uso.

3.2.3 Cultura de Células Epiteliais Mamárias

As células epiteliais mamárias humanas imortalizadas, HB4A, foram doadas pelos Drs. Michael J. O'Hare e Alan McKay, Ludwig Institute for Cancer Research, Londres, Reino Unido, e foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino, inativado por calor (Gibco BRL, Gaithersburg,

EUA), 5 µg/mL de insulina bovina (Sigma), 5 µg/mL de hidrocortisona (Sigma).

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

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

3.2.4 Co-culturas de fibroblastos e células epiteliais

3.2.4.1 Co-culturas separadas por insertos

Para a realização dos ensaios de co-cultura as células epiteliais foram semeadas em placas de 6 poços com 9,6 cm² de área/poço (Becton Dickinson Labware, USA) em uma densidade de 70% de confluência na superfície de cada poço, usando-se 3 mL de DMEM (Dulbecco's)/Ham's F-12 (Cultilab), na proporção de 1:1, suplementado com soro de cavalo 5% (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA), 20 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF) (Sigma), 100 ng/mL de toxina colérica (Calbiochem), 0,01 mg/mL de insulina bovina (Sigma) e 500 ng/mL de hidrocortisona (Sigma), 100 µg/mL de ampicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Passadas 24 horas do plaqueamento inicial das células epiteliais foram colocados, dentro de

cada poço, insertos com membranas de 4,2 cm² de área e poros de 0,4 µm (Becton Dickinson Labware, USA). Sobre a membrana destes insertos foram semeados os fibroblastos, numa proporção de 30% em relação ao número inicial de células epiteliais, usando-se 2,5 mL DMEM (Dulbecco's), suplementado com soro fetal bovino 10% (FBS), 100 µg/mL de ampicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B. As co-culturas foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera constante de 5% de CO₂ por um período de 72 horas.

3.2.4.2 Recuperação das células após co-culturas separadas por insertos

As células em co-cultura separadas por insertos foram recuperadas isoladamente, após 72 horas em cultura, utilizando-se um cell scraper (Corning Incorporated, NY, USA) e TRIZOL[®] (Life Technologies, Inc.). Inicialmente, acrescentou-se 200 µl do reagente a cada um dos insertos contendo as células epiteliais, assim como, aos poços da placa com os fibroblastos aderidos. As células foram, então, raspadas e o volume das células em TRIZOL[®] colocado separadamente em tubos de 1,5 mL devidamente identificados, este procedimento repetiu-se por mais uma vez para garantir maior eficiência na raspagem das células. As amostras foram estocadas a -70°C para posterior extração do RNA total de ambos os tipos celulares.

3.3 Ensaio de Imunocitoquímica

Realizamos ensaio de imunocitoquímica para verificar se as células que migraram dos explantes eram de fato fibroblastos. Utilizamos os seguintes anticorpos: anti-vimentina, anti-actina de músculo liso e anti-citoqueratina, nas seguintes diluições: 1:200, 1:200 e 1:100, respectivamente como primeiros anticorpos e anti-mouse conjugado com TRITC na diluição de 1:100 como segundo anticorpo. 1×10^5 células foram plaqueadas sobre lamínulas em placa de 24 poços com 24 horas de antecedência a realização do ensaio. Decorrido este período, as células foram gentilmente lavadas com PBSA e fixadas em paraformaldeído 1%, por 15 minutos. Feito isso, as células foram permeabilizadas com Triton X 0,1%, por 5 minutos. Após 3 lavagens sucessivas, de 10 minutos cada, com solução de PBSA/BSA 0,2%, houve o bloqueio das células com solução de PBS/BSA 2%, por 30 minutos. As células foram então incubadas nos primeiros anticorpos por 1 hora. A esta incubação seguiram-se 3 novas lavagens, como as anteriores, quando então as células foram incubadas durante 1 hora com o segundo anticorpo conjugado com TRITC. Todas as incubações foram realizadas a temperatura ambiente. Finalmente, as células foram novamente lavadas como feito anteriormente, e as lamínulas foram montadas em lâminas e visualizadas ao microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse E600).

3.4 Verificação da Proliferação Celular

A quantificação da proliferação celular foi feita através do kit WST-1 da Roche, que se baseia na clivagem do sal tetrazólio (MTT) em formazan

através da enzima succinato-tetrazólio reductase, presente na cadeia respiratória da mitocôndria e ativa apenas em células viáveis. Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade inicial de 1×10^3 células/poço e incubadas com uma solução de MTT por aproximadamente 04 horas. Após este período de incubação forma-se uma solução corante que foi medida através de um espectrofotômetro (leitor de ELISA), desse modo, correlacionou-se a absorvância com o número de células. Esta correlação foi realizada através do programa GraphPad Prism®, versão 3.0 (GraphPad Software).

3.5 Extração de RNA total

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

3.6 cDNA microarray

As lâminas de *cDNA microarray* 4.8K002 são constituídas de clones de ORESTES que respeitam os seguintes critérios para inclusão: i) Clone de *full length*; ii) Clone com tamanho maior que 300 pares de bases com seqüência de alta qualidade (conteúdo de CG); iii) Clone que quando pesquisado no site: <http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast> resultou em gene com identidade > que 85% em 100 pb; e iv) Clone com seqüência mais 3'. Esta lâmina é composta por 4.608 genes diferentes, além dos controles positivos e negativos. Dos 4.608, genes 2.159 apresentam função conhecida, sendo categorizados em 505 classes funcionais distintas.

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

Os produtos de PCR foram fracionados em gel de agarose 1%, o qual foi corado com brometo de etídio, a fim de verificar a presença de ampliações inespecíficas. No passo seguinte os produtos foram purificados utilizando-se o produto *QIAquick 96 PCR Purification* (Quiagen, Alemanha) e fixados a lâminas de vidro utilizando o robô Flexys (Genomic

Solutions, Reino Unido). Foram dispensados 50-75 nL de suspensão contendo o inserto, correspondendo, aproximadamente a 10 pg de DNA em cada ponto. Após a deposição, a fixação do cDNA deu-se em luz ultravioleta a $90 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ (UV cross linker, Stratagene, EUA), seguida de incubação a 80°C durante 2 a 4h. As lâminas foram estocadas em dissecador sob vácuo.

3.7 Protocolo de Amplificação de RNAm

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

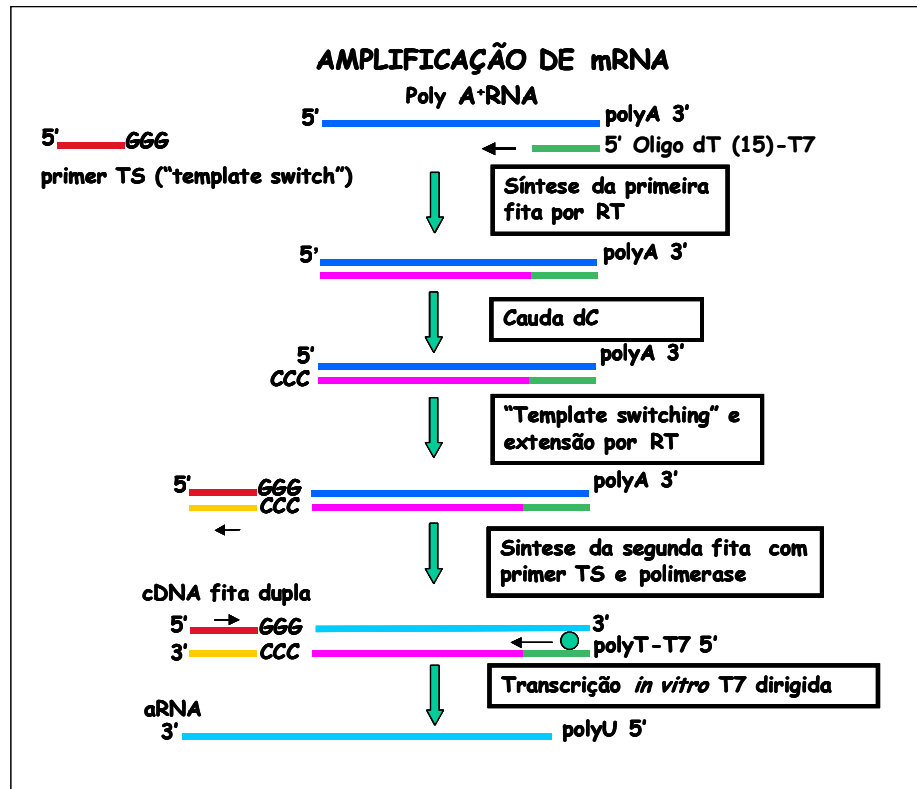
transcriptase (Invitrogen). A síntese de cDNA é completada por 2 horas a 42°C seguida de desnaturação a 70°C por 15 minutos.

A segunda fita de DNA é sintetizada por adição, na reação anterior, de 106 µL de H₂O DEPC, 15 µL “Advantage PCR buffer” (Clontech, Palo Alto, CA), 3 µL dNTP 10 mM, 1 µL RNase-H (Promega, Madison, WI) e 5 µL “Advantage cDNA Polymerase” (Clontech). No termociclador os seguintes ciclos de temperatura foram utilizados: 37°C por 20 minutos para digestão do mRNA, 94°C por 3 minutos para desnaturação do cDNA, 65°C por 3 minutos para anelamento específico do primer TS e 75°C por 30 minutos para a extensão final. O cDNA dupla fita é purificado por adição de 150 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), inversão por 20 segundos e centrifugação 14000 x g por 5 minutos. A fase aquosa é transferida para um novo tubo, ao qual adiciona-se 70 µL de acetato de sódio 3M e 500 µL de etanol absoluto. Este material foi então precipitado por centrifugação a 14000 x g por 20 minutos a temperatura ambiente e lavado 2 vezes com etanol 70%, sendo cada centrifugação de 14000 x rpm por 2 minutos. As amostras secaram a temperatura ambiente por aproximadamente 40 minutos, foram ressuspensas em 20 µL de H₂O DEPC e guardadas em freezer a -20°C para a próxima etapa.

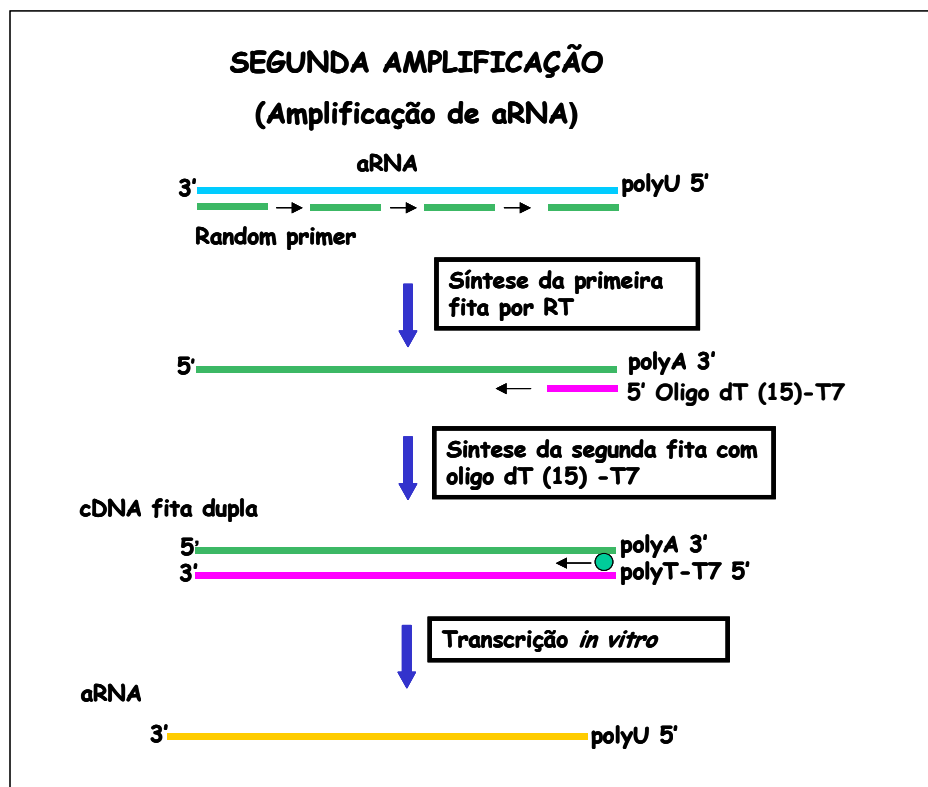
Para a reação de transcrição *in vitro* utiliza-se o kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems-SP6, T3, T7 (Promega). Adiciona-se à solução de 20 µL de cDNA dupla fita 10 µL de tampão de reação, 15 µL rNTP 25 mM e 5 µL do mix da enzima de transcrição T7 RNA Polimerase. Essa reação é incubada por 6 horas a 37°C. O RNA amplificado (aRNA) é

purificado e o cDNA dupla fita removido pelo método de TRIzol[®] (Life Technologies). A concentração é determinada por leitura da absorbância a 260 e 280 nm (GeneQuant, Clamart Cedex, France).

Para a segunda etapa de amplificação de mRNA, parte-se de 1 a 5 µg do aRNA (RNA amplificado) anterior em 7 µL de volume, se necessário as amostras são concentradas em Speed Vac (Speed Vac Concentrator, Savant). Adiciona-se 3 µL (2µg/µL) de random hexamer primer (dN6; AmershamPharmaciaBiotech, UK). A síntese de cDNA é realizada adicionando-se 5 µL do “first-strand buffer” 5X (Invitrogen), 2 µL dithiotreitrol 0,1 M (DTT; Invitrogen), 2 µL dNTP 10 mM e 1 µL RNasin (Promega, Madison, WI), a reação é incubada por 10 minutos a 65° C seguida do acréscimo de 2 µL “Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Essa reação é incubada por 2 horas a 42°C, ao final desta incubação, adiciona-se 1 µl de RNase H que agirá por 20 minutos a 37° C. A síntese da segunda fita de cDNA utiliza o primer oligo dT (15)-T7 com o sítio promotor do fago bacteriano T7 com os reagentes descritos no protocolo da primeira etapa de amplificação. As etapas de purificação de cDNA dupla fita e da transcrição *in vitro* e purificação com TRIzol[®] também seguiram o protocolo anterior.



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



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

As células epiteliais mamárias HB4A foram utilizadas como “referência” nas hibridizações de microarray, ou seja, foram um fator denominador comum entre as amostras. Para tanto, amplificamos o RNA extraído desta linhagem celular diversas vezes para obter uma massa crítica suficiente para utilização em todas as hibridizações posteriores. Dessa forma, garantimos que todas hibridizações tiveram como referência uma única amostra de RNA original. Na figura 01 podemos visualizar um exemplo de RNA amplificado, no qual os transcritos situam-se entre 400 e 700 bp, caracterizando uma amplificação de boa qualidade.

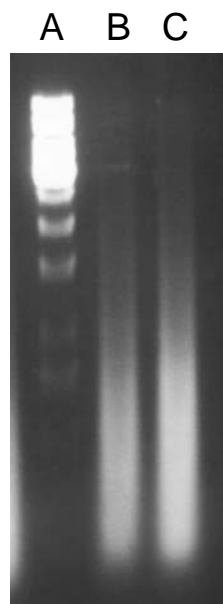


Figura 02: A. Padrão de peso molecular (100 bp), B. e C. RNA amplificado de células epiteliais mamárias HB4A.

3.8 Hibridização em lâminas de vidro

As hibridizações das lâminas foram realizadas no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer em colaboração com o grupo da Dra Dirce Maria Carraro.

As lâminas foram pré-hibridizadas a 42°C durante 8 horas e montadas imediatamente na estação de hibridização GeneTac 2000 (Genomic Solutions, Reino Unido).

A partir do RNA amplificado foi sintetizada a sonda de cDNA marcada fluorescentemente através de uma reação de transcrição-reversa. 8 µg deste material foram precipitados com 10% de acetato de sódio 3M e 3 volumes de etanol a - 70°C por, no mínimo, 16 horas. Em seguida, o RNA foi centrifugado e lavado com etanol 70%. O RNA foi dissolvido em 4 µL de água tratada com DEPC e aquecido a 70°C por 10 minutos na presença de 2,5 µg de oligo dT (Oligo dT₁₂₋₁₈, Gibco BRL) para abertura de possíveis estruturas secundárias sendo, em seguida, resfriado em gelo por 2 minutos. Os mRNAs foram transcritos reversamente à primeira fita de cDNA na presença de 400U da enzima transcriptase-reversa (SuperScript II, Gibco BRL), 500µM de cada desoxinucleotídeo dATP, dGTP e dCTP e 100µM de dTTP, 1mM DTT, 1X de tampão de transcrição reversa (Gibco), 40U de inibidor de Rnase (Rnasin, Promega) e 3 mM de Cy-3 dUTP/Cy-5 dUTP em uma reação com volume final de 50µL. A reação de síntese de cDNA foi então incubada a 42°C por 2 horas sendo a hidrólise do RNA feita pela adição de 1,5µL de EDTA 0,5M e 1,5µL de NaOH 0,1M, seguida de incubação a 70°C durante 20 minutos, esta reação foi neutralizada pela adição de 1,5µL de HCl 1M.

Os nucleotídeos não incorporados foram removidos através de uma etapa de purificação em microcoluna Autoseq G50 (Amersham Pharmacia, cat # 27-5340-01). A sonda de cDNA foi então dissolvida em 47,5µL de

tampão de hibridização (10X SSC, 0,2%SDS) e 23,75 μ L de formamida deionizada (Sigma). Quantidades iguais das sondas de cDNA marcadas fluorescentemente e correspondentes a cada uma das amostras a serem comparadas foram misturadas e aquecidas a 95°C por 5 minutos. Para hibridização, adicionou-se todo o volume das sondas sobre a lâmina de microarray a ser hibridizada. A hibridização foi feita em estação de hibridização a 42°C durante 24 horas

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

3.9 Análise matemática dos dados

A próxima etapa do processo foi o de eliminar todos os pontos da lâmina que apresentavam $[I \text{ spot} - (I \text{ back} + 2 \text{ SD})] > 0$, onde $I \text{ spot}$ = intensidade do spot; $I \text{ back}$ = intensidade do controle negativo e todos os pontos com intensidade $>$ que 63000 que foram considerados saturados [65550 = 16 BIT], portanto foram retirados da análise aqueles pontos com sinal próximo do controle (ruído) e aqueles que apresentaram saturação de hibridização. Neste último caso, o excesso de material hibridizado gera sinal muito intenso que, supera a capacidade do detector de medir a intensidade

de fluorescência, e invalida a quantificação e comparações, devendo, portanto, ser eliminado de futuras análises.

O processo de quantificação é a normalização da intensidade do sinal, conforme revisto por Quackenbush, *et al.*, 2001 e Quackenbush, *et al.*, 2002. A normalização permite o ajuste de possíveis diferenças em quantidades iniciais de RNA entre as duas amostras utilizadas no ensaio e permite também o ajuste de variações de marcação e de eficiência de detecção entre os fluorocromos utilizados. Assumindo que o número de moléculas em cada amostra é igual, isto é, se a representação de uma espécie de RNA aumenta, a de outra espécie diminui, aproximadamente o mesmo número de moléculas marcadas deve hibridizar com os *arrays* e a intensidade total de todos os elementos do *array* deve ser a mesma para cada amostra. Um fator de normalização é então calculado, pela somatória das intensidades de sinal medidas em ambos os canais. Este fator ajusta a expressão de cada molécula de modo que a razão entre todos os elementos é igual a 1 e o processo é denominado normalização pela energia total. A réplica técnica ou inversão de corantes para marcação da mesma amostra, foi utilizada para identificar variações que possam ocorrer durante a marcação da amostra com fluorocromo, isto é, caso determinado cDNA apresente marcação preferencial com o fluorocromo verde ou vermelho. Como estamos fazendo comparações entre amostras idênticas, espera-se que obtenhamos medidas consistentes, isto é, sem variações. Portanto, sinais de hibridização correspondendo à expressão de um mesmo gene, mas cuja energia total foi

diferente entre a mesma amostra marcada com os diferentes fluorocromos, foram eliminados de futuras análises.

Para identificar os genes diferencialmente expressos calculou-se o logaritmo da razão da expressão de cada gene da célula analisada em relação a células de referência (\log_2 razão), assumiu-se que estes valores têm distribuição normal. Através da distribuição normal das comparações determinamos os valores da média e do desvio padrão (SD) que foram considerados para a determinação dos valores das razões ($p < 0,05$) a partir dos quais, os genes foram considerados diferencialmente expressos. A expressão adotada para a determinação destes valores foi: $\text{media} \pm (1,96 \times \text{SD})$.

4 Resultados

4.1 Obtenção de Banco de Cultura Primária de Fibroblastos e Células Epiteliais Mamárias

Após estabelecer em nosso laboratório a cultura primária de fibroblastos, expandimos as culturas obtidas para que pudessem ser congeladas e usadas subsequente em nossos ensaios. O mesmo procedimento foi efetuado quanto à linhagem epitelial obtida da ATCC. Podemos visualizar nas figuras 03, 04 e 05 exemplos destas células em cultura.

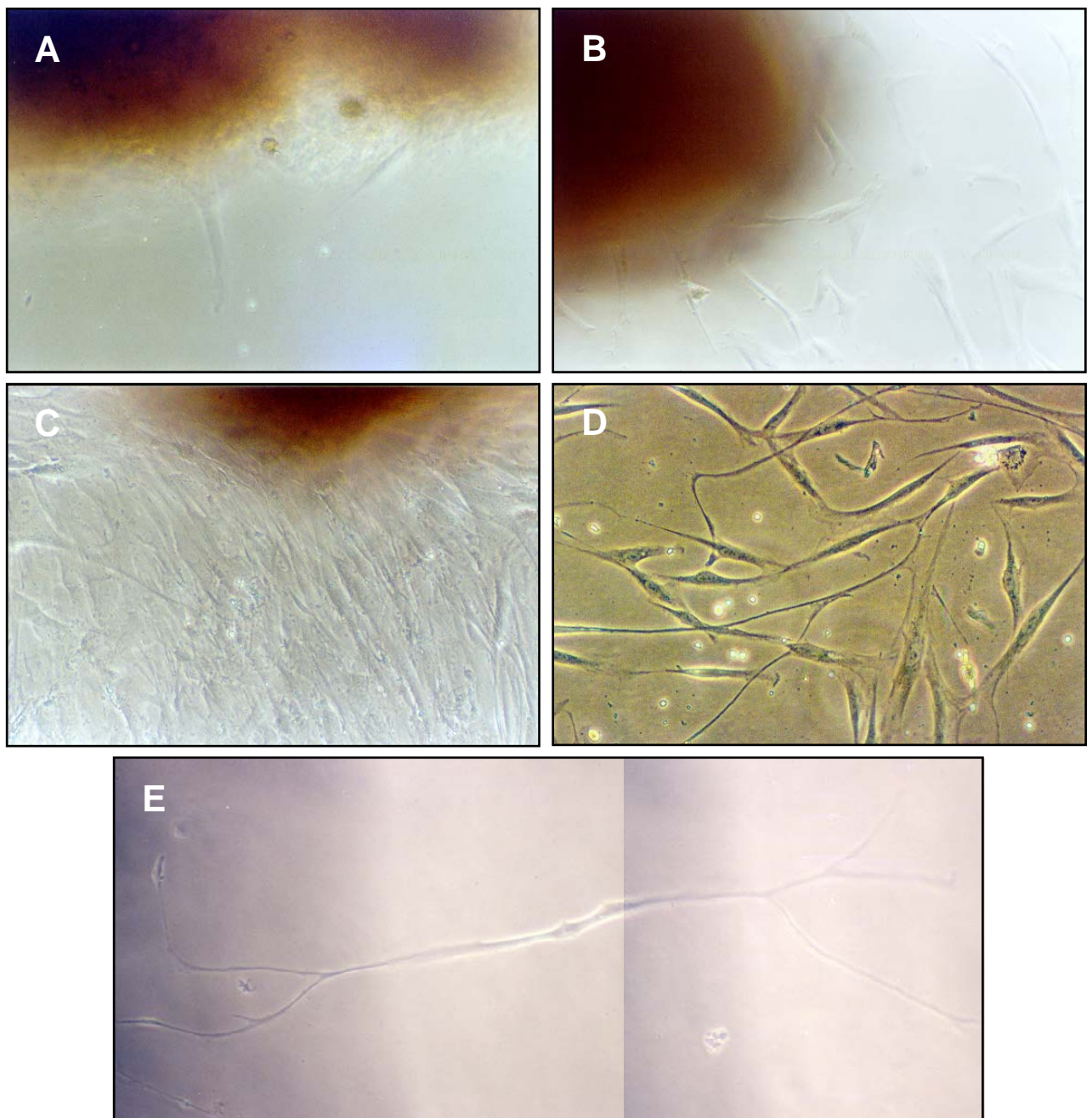


Figura 03: Fibroblastos de cultura primária de tecido mamário em diferentes etapas. (A) Início da migração dos fibroblastos do explante, após 7 a 10 dias de cultura. (B) 12 a 15 dias de cultura. (C) 15 a 20 dias de cultura, antes da remoção dos explantes. (D) e (E) Cultura de fibroblastos em passagem 01, após retirada dos explantes. (100X).

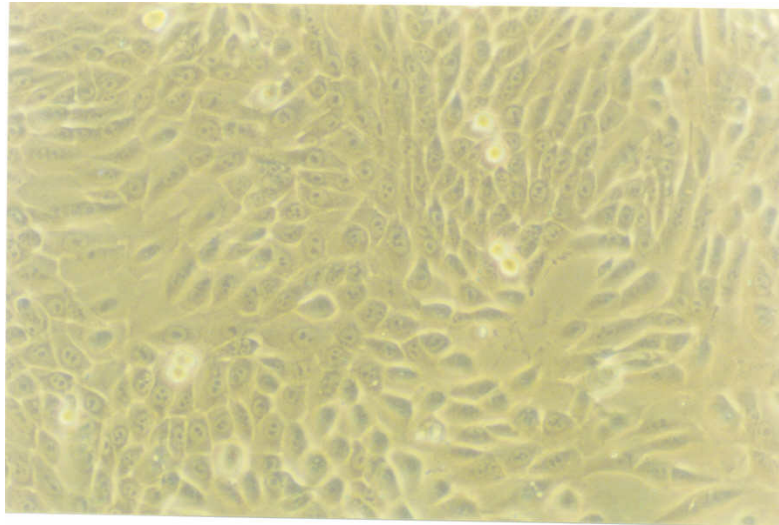


Figura 04: Células epiteliais mamárias normais MCF-10A em cultura (aumento 100X).

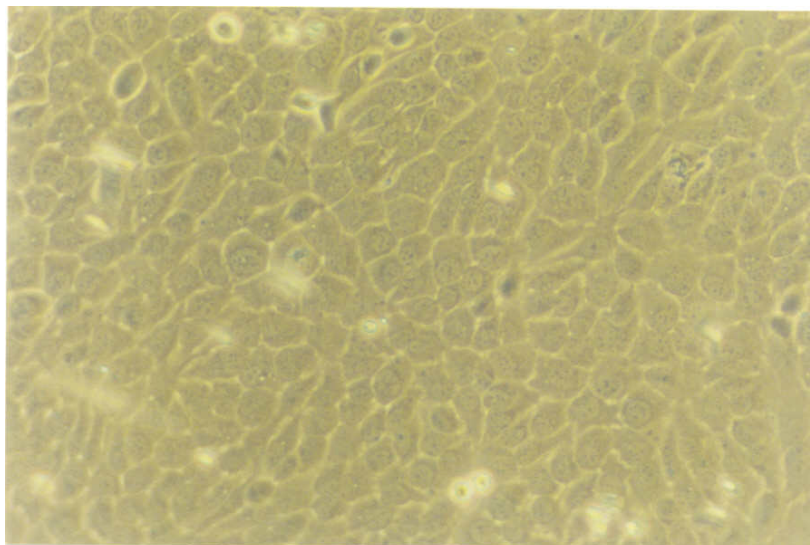


Figura 05: Células epiteliais mamárias humanas normais HB4A em cultura (aumento 100X).

4.2 Caracterização da Cultura Celular de Fibroblastos

Para verificar se a cultura obtida estava livre de contaminação por células epiteliais, realizamos ensaios de imunocitoquímica utilizando os

seguintes anticorpos: vimentina, actina de músculo liso e citoqueratina. Como podemos ver na figura 06, os fibroblastos foram caracterizados pela expressão de vimentina e actina de músculo liso tanto em fibroblastos provenientes de doenças benignas de mama quanto em fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico de todos os casos selecionados para o trabalho, o mesmo não ocorreu para citoqueratina, um típico marcador de células epiteliais. Verificamos uma positividade de mais de 90% em todos os casos.

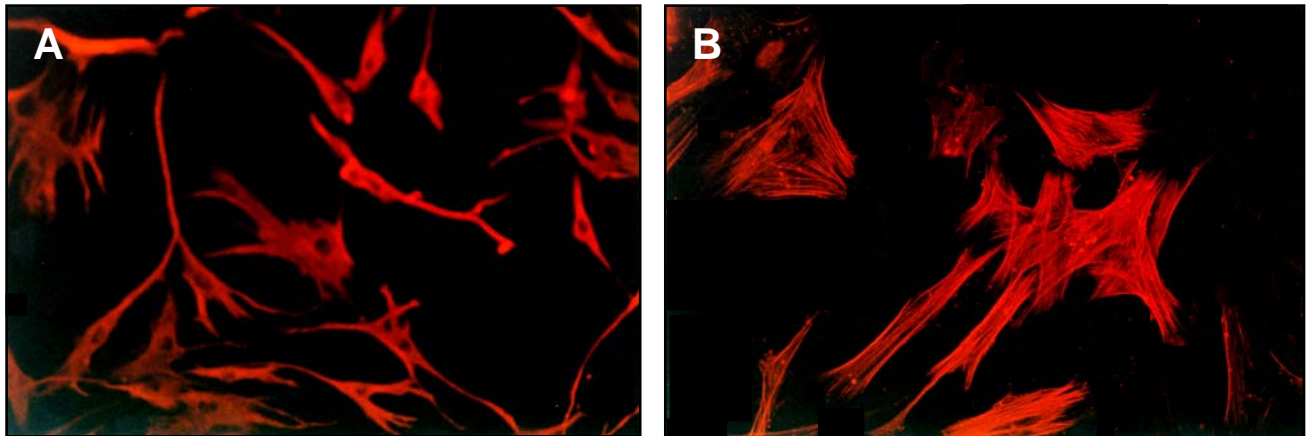


Figura 06: Os fibroblastos de cultura primária de tecido mamário foram caracterizados por imunocitoquímica. Em (A) vemos marcação positiva para vimentina e em (B) para actina de músculo liso. (200X).

4.3 Curva de Proliferação Celular de Fibroblastos

Provenientes de Lesões Benignas e Tumores Malignos

Para determinação da proliferação celular, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com solução de tetrazólio de sódio como descrito anteriormente. Foi realizado um intervalo de 0 a 120 horas, sendo que o tempo 0h serviu como parâmetro para as contagens posteriores. Como podemos visualizar no gráfico 01, os fibroblastos derivados de tecido mamário não neoplásico e neoplásico apresentaram um crescimento semelhante ($p = 0,5590$).

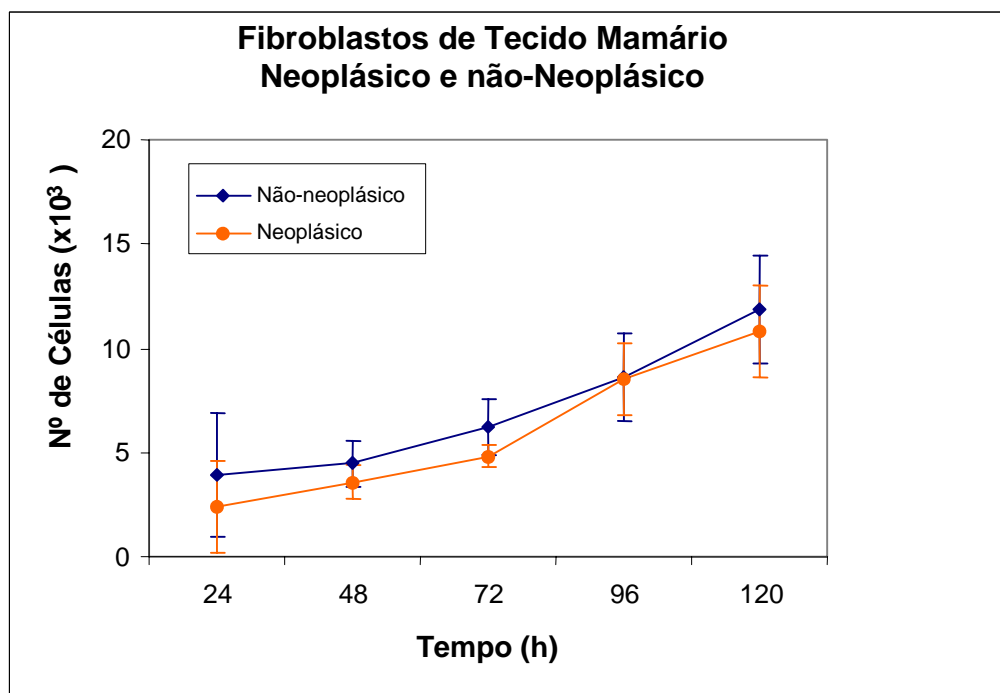


Gráfico 01: Curva de proliferação de fibroblastos originados de tecido mamário neoplásico e não neoplásico.

4.4 Co-Cultura Separada por Insertos

As co-culturas foram realizadas como descrito anteriormente. Na figura abaixo podemos ver um exemplo de co-cultura entre um fibroblasto derivado de tecido mamário neoplásico e células epiteliais mamárias MCF10A.

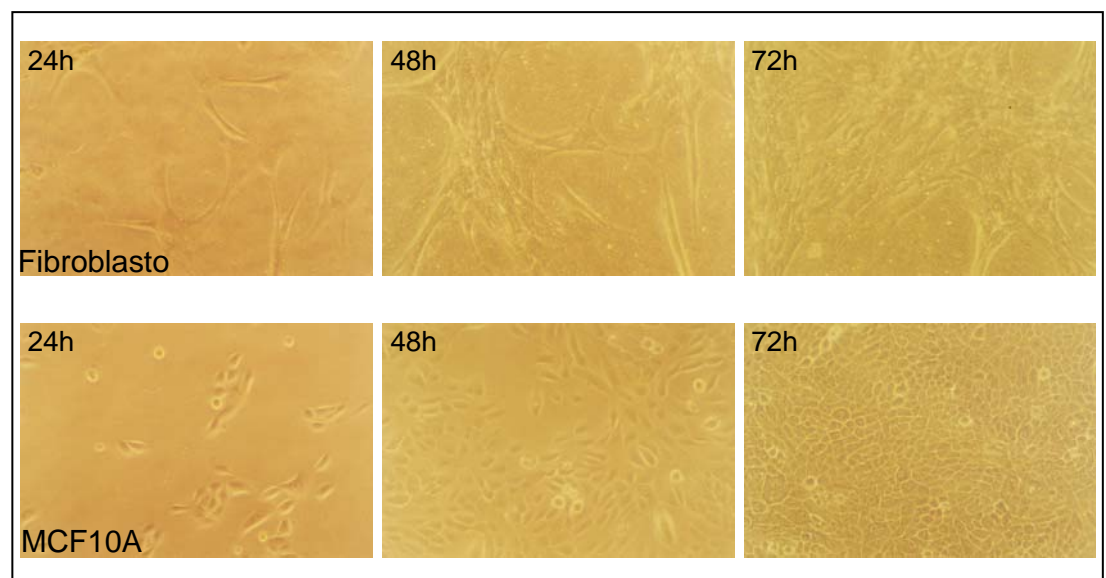


Figura 07: Co-cultura entre fibroblasto originário de tecido mamário neoplásico e células epitelial mamária MCF10A. (100X).

4.5 cDNA Microarray

Através da técnica de cDNA microarray comparamos o perfil de expressão gênica entre fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico e não- neoplásico e avaliamos a influência das células epiteliais mamárias MCF10A no perfil de expressão gênico dos fibroblastos originados de tecido mamário neoplásico. As seguintes comparações foram realizadas:

Fibroblastos originários de tecido mamário não-neoplásico (G6) X Fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico (G4)
Fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico após co-cultura com MCF10A (G3) X Fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico.

4.5.1 Análise Quantitativa

Para a análise quantitativa foi utilizado o teste *t-Student*, utilizamos como critério de exclusão de genes falso-positivo os valores encontrados para *Positive False Discovery Ratio* (pFDR), um teste estatístico de correção múltipla, sendo cortados das análises aqueles genes com valores de FDR maiores que 0,05.

Nossa primeira intenção foi caracterizar o perfil gênico diferencial entre fibroblastos originários de tecido mamário não-neoplásico (G6) e neoplásico (G4). Quando comparamos os grupos G4 e G6, encontramos 283 genes diferencialmente expressos. Dentre estes, 187 estão regulados negativamente em G4 (variação de expressão de 1,05 a 4,14) e 96 regulados positivamente (variação de expressão de 1,17 a 7,73). A representação gráfica dos genes que foram diferencialmente significativos pode ser visualizada na figura 08.

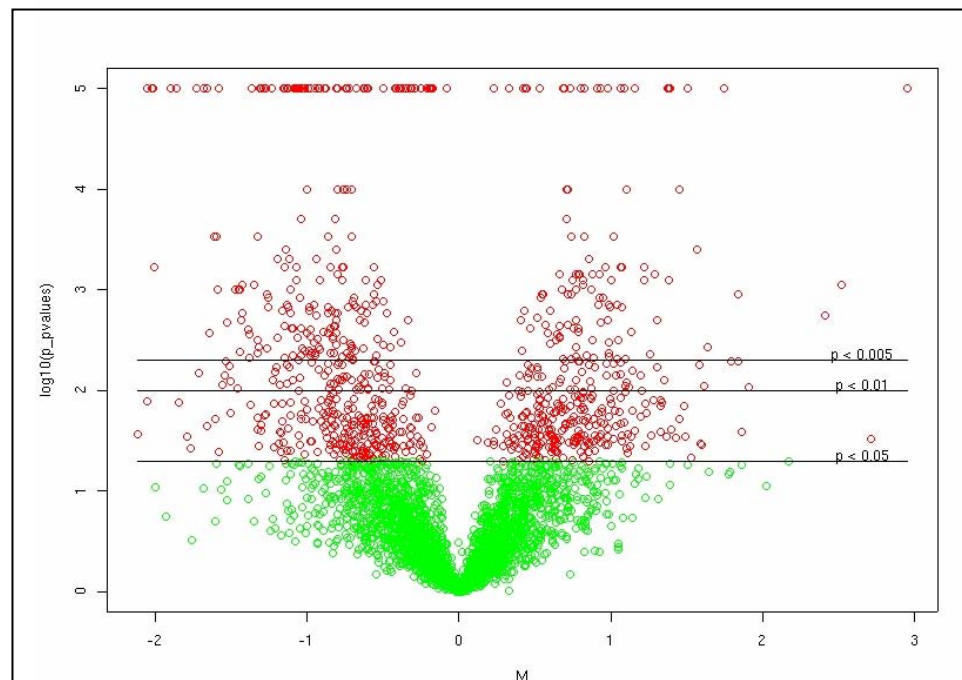


Figura 08: Gráfico Volcano da comparação G4 x G6 mostrando os genes diferencialmente expressos de acordo com o nível de significância.

Os genes diferencialmente expressos nesta comparação foram classificados segundo o *Gene Ontology* (GO) para processos biológicos. A distribuição funcional deu-se principalmente nos seguintes grupos: 62,26% de genes regulados positivamente em G4 vs 66,98% negativamente regulados classificados como metabolismo; 39,62% regulados positivamente em G4 vs 38,68% regulados negativamente como processos fisiológicos celulares e 32,08% positivamente regulados vs 31,13% negativamente regulados como comunicação celular. Estes genes podem ser visualizados na tabela abaixo.

Tabela 01: Classificação ontológica do grupo G4.

Processos	Genes	
	UpG4	DownG4
Comunicação Celular	AKAP11 ARF4 ARHGDIB ARL1 CDC42BPA ChGn FES GLUL IL15 LITAF PMP22 RAB4A RAP2C RASA1 RGS12 STAM STK24	ADCY3 ADCY7 AES ARRB1 ATP2C1 BCAR3 CELSR2 CHUK CX3CL1 DOCK1 DUSP9 EDG1 FGFR1 FLOT2 GAD1 GMDS IGSF1 KDR KIF1B MK-STYX NCOA6 PARD3 PREX1 RAB27A RAB3A RPS6KC1 SNX12 STK17 STK22C TBL3 TENC1 TXNRD1 VIPR1
Metabolismo	ASAH1 C1RL CAPZA2 CBR1 CDC42BPA ChGn CHST12 CTCF CTSC FES GC20 GLUL GRSF1 HNRPH3 LITAF MBD2 ME1 MGAT4B MOXD1 NEURL NUP133 OAT PCBP1 POLG RNF11 RNF141 RNF20 RPE STK24 UBE2V2 ZNF140 ZNF274 ZNF305	AARS ACADS ADCY3 ADCY7 AES APOBEC1 ASTN2 ASXL1 ATE1 ATP11B ATP2C1 ATP5G2 BRCA1 C40 CAD CCNA2 CCT2 CDC91L1 CHC1 CHUK DIA1 DUSP9 EIF2B1 EIF5B ENO3 FGFR1 FLJ11164 GAD1 GMDS HIVEP2 HNRPF HNRPU HRD1 HRI JMJD2A JMJD2B KDR KIAA0674 LOC51136 MCCC1 MK-STYX NAB1 NCOA6 PGM2 POLR2E PPIL1 PREX1 PWP1 RNASE4 RPS6KC1 SARS SGK SRPK1 SRPK2 STK17B STK22C TAF2 TEAD2 TFDP1 TMPRSS2 TOMM20 TPR TXNRD1 UBA2 UBE2A ULK2 UNG WHSC1 ZFP276 ZNF384 ZNF516
Processos Fisiológicos Celulares	ARF4 ARHGDIB CAPZA2 CDR1 ChGn CLCN5 CTCF FES GOSR1 IL15 KDELR3 NUP133 PDGFC PMP22 POLG RAB4A RASA1 SCFD1 SLC35C1 STAM UBE2V2	ACPP ARFGAP3 ATP11B ATP2C1 ATP5G2 BCAR3 BIN1 BRCA1 C40 CCNA2 CCT2 CHC1 CX3CL1 DIA1 DKFZp76111011 DOCK1 ERAL1 GOPC KIF1B MAP4 NCOA6 PACSIN1 PARD3 PREX1 RAB3A SGK SLC35B1 SLC4A2 SLC5A6 SNX12 SRPK1 STK17B TFDP1 TM9SF4 TNFAIP1 TOM1L2 TOMM20 TPD52L2 TPR VIPR1 WDR11

Na comparação entre G3 e G4, ou seja, entre fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico em co-cultura com MCF10A vs fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico, encontramos 566 genes diferencialmente expressos, sendo 323 regulados negativamente (variação de expressão de 1,09 a 10,62) e 243 regulados positivamente (variação de expressão de 1,03 a 16,03) em G3, na figura abaixo podemos visualizar graficamente os genes que entraram nesta comparação.

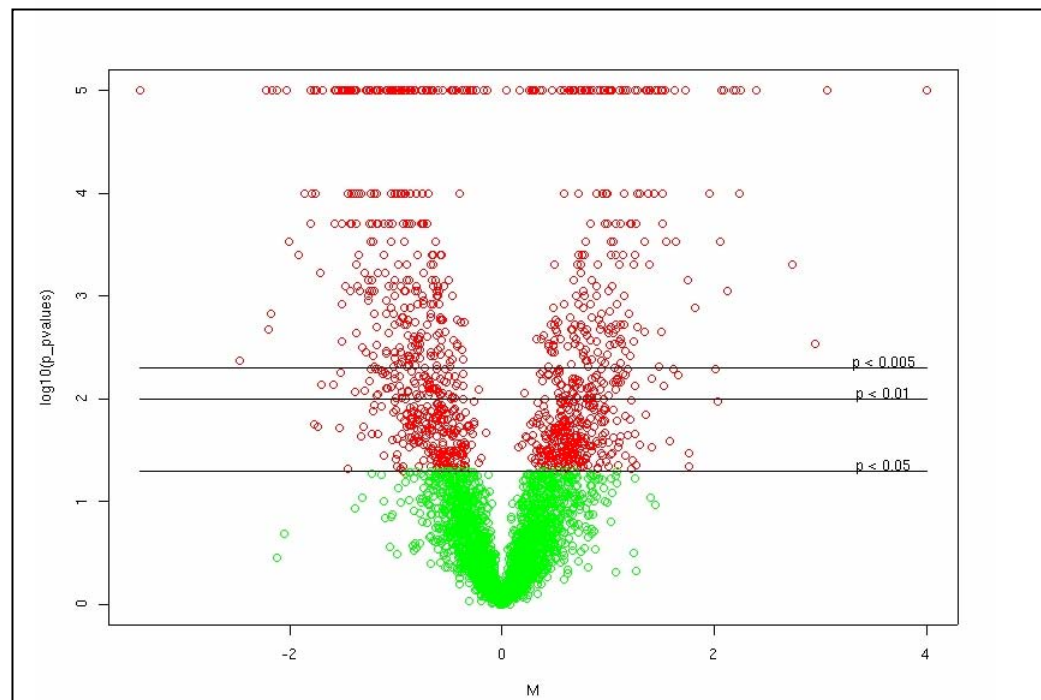


Figura 09: Gráfico Volcano da comparação G3 x G4 mostrando os genes diferencialmente expressos de acordo com o nível de significância.

A distribuição funcional dos genes encontrados em G3 deu-se da seguinte maneira: 66,14% regulados negativamente vs 64,71% regulados positivamente para metabolismo; 42,33% vs 39,71% para processos fisiológicos celulares e 28,04% vs 30,15% para comunicação celular, respectivamente (tabela 02).

Tabela 02: Classificação ontológica do grupo G3

Processos	Genes	
	UpG3	DownG3
Biológicos Comunicação Celular	ADORA2B ARF4 ARHGDIB ARL1 C11orf15 CDC42BPA CLCN6 COMMD3 CORO1C CSNK2A2 CTGF DFFA EDNRB ENTPD1 EPHA4 FRAT2 GLUL GUCY1B3 IFNGR1 IL15 IL18R1 IMPA2 LITAF LOC84661 MGST3 NPR2 NR4A2 PMP22 PRKAG1 RAB31 RAB4A RAP2C RGS2 RIN2 SFRP1 SNX5 SPEC1 STMN2 SYPL TACR2 TIEG	ADAM12 AES AKT1 ARHGAP4 ARRB1 ASC ATP2C1 BCAR3 C3 C6orf4 CAMK2B CD59 COL6A1 DGCR2 DOCK1 DPYSL3 DSC3 FASTK FGFR1 FLOT2 FMOD GJA1 GMDS HMOX1 IGSF1 INADL ITGB6 LGALS1 LIMK1 LTBR MAP2K3 MAPK13 MKNK2 NRP1 OPTN OSTF1 PAK4 PRDM4 RAB5C RANGAP1 RPS6KC1 SFN SHC1 SNX12 SPHK1 STAT6 STK22C TBL3 TGFB1 TPBG TRAF3 TXNRD1 YWHAH
Metabolismo	AASDHPPT ADORA2B ASAH1 ATP1A3 ATP5L B3GNT5 BAZ2B BLVRA C1RL CAPZA2 CDC42BPA CDKN1B CITED2 CLK1 COMMD3 COX5B COX7B CRYL1 CSNK2A2 CTGF CUL2 CUTL1 DFFA DSIPI EIF3S1 EPHA4 FLJ21963 FLJ37306 GLUL GSTA4 GTF2A2 GTF2E2 GUCY1B3 HADHB HADHSC HNRPH3 IMPA2 KIAA0303 KIAA1361 KUB3 LGP2 LITAF MAN1C1 MGAT4B MGST3 MKRN1 MMP24 MOXD1 MPV17 MTMR1 NDN NFYC NOLA3 NPR2 NR4A2 NUP133 OGG1 PAWR PCYOX1 PGCP PHF3 PHYH PIM1 POLK PRKAG1 PRPSAP1 PRSS11 PTPN4 RAD1 RDH- E2 RPA1 RPE RPL18 RPL22 SEC63 SIAT7B SIAT9 SSBP2 STAR SUMF1 TIEG TM4SF2 TRIM32 TTC1 TTLL1 TXNDC4 UBE4B UXT	ACLY ACSL4 ADAM12 ADSS AES AKT1 ALG8 ARIH2 ASXL1 ATIC ATP11B ATP2C1 ATP9B B4GALT2 C2F C40 CAD CAMK2B CAPN1 CAPN2 CCT2 CCT7 CDC91L1 CDS2 CHC1 CRAT CREB3 CS CSE1L CUL3 CYP27B1 DDB1 DDX23 DGAT1 DHCR24 DIA1 DPYSL3 EIF2B5 EIF4EBP2 EIF5B ELK1 FADS2 FASTK FBXL8 FDPS FGFR1 FLJ11164 FLJ20084 FLJ20277 GMDS GPT2 H105E3 HEAB HMOX1 HNRPF HNRPU HRD1 HRI HSPH1 ILF3 KIAA1055 KPNA1 LCN7 LIMK1 LOC115294 LOC57168 LRSAM1 LSM4 MAP2K3 MAPK13 MBD3 MCM4 MICAL2 MKNK2 MRPL44 MRPS17 NACA NFATC2 NFIX NRD1 PAK4 PDK4 PHTF1 PI4KII POLR2E PPARA PPIL1 PPP1R10 PRDM4 PRKCBP1 PRPF8 PSMD8 PTDSS2 PWP1 RNASE4 RPS6KC1 SEC14L2 SFN SFRS5 SH3MD2 SHC1 SLC34A2 SOAT1 SPHK1 SRPK1 SRPK2 STAT6 STK22C SUPT5H TCFL1 TEAD2 TFDP1 TOMM20 TRAF3 TRIM47 TRPC4AP TXNRD1 TXNRD3 UBA2 UBE2A UBE2Q UBE3B USP14 WWP2 YWHAH

Processos	ADORA2B ARF4 ARHGDIB	ABCF2 ABLIM2 AKT1 ALG8
Fisiológicos	ATP1A3 ATP5L C1QB	ARFGAP1 ARHGAP4 ASC
Celulares	CAPZA2 CDKN1B CDR1	ATP11B ATP2C1 ATP9B BCAP31
	CLCA1 CLCN5 CLCN6	BCAR3 BCL2L1 C2F C40 CAPN1
	CLK1 COL4A1 CORO1C	CAPZB CCT2 CCT7 CHC1
	CTGF CUL2 DFFA FRAT2	COL6A1 CRAT CSE1L CUL3SFN
	HIAT1 IL15 KCNK2	CYP27B1 DBN1 DIA1 DOCK1
	LAPTM4A NDN NGFRAP1	ERAL1 FASTK GAS2L1 GBF1
	NOLA3 NUP133 PAWR	GJA1 ILF3 KCNK6 KCTD15
	PDGFC PIM1 PLSCR4	KIAA0446 KPNA1 LCN7 LGALS1
	PMP22 PPP1R12A	LIMK1 LRP1B LTBR MAPK13
	PRSS11 RAB31 RAB4A	MCM4 MYO18A NFIX NRP1
	RAD1 RGS2 RIN2 RPA1	NUP62 OPTN PAK4 PPP1R10
	SCFD1 SEC8L1 SESN1	PRDM4 PSMD8 RAB5C RER1
	SFRP1 SLC19A2 SLC35C1	SCN2A2 SEC14L2 SEC22L3
	SNX5 SSR4 STAR SYPL	SHC1SPINL SLC1A5 SLC34A2
	TACR2 TIEG TXNDC4	SLC39A14 SLC4A2 SNX12
	UBE4B	SRPK1 STX3A SUPT5H TFDP1
		TGFB1 TOMM20 TPBG TPD52L2
	TRAF3 TRPC4AP WDR11 YKT6	
	YWHAH	

5 Discussão

A cultura primária de fibroblastos provenientes de tecido mamário tumoral ou de doença benigna de mama foi estabelecida com sucesso. Após a caracterização destas células por imunocitoquímica criamos um banco destas células congeladas, bem como das células epiteliais utilizadas neste trabalho.

A expressão de vimentina e a ausência de expressão de citoqueratina foram indicativas de que a cultura estabelecida estava livre de contaminação por células epiteliais, além disso, a expressão de actina de músculo liso indica de que se trata de miofibroblastos, uma vez que este marcador é característico deste tipo celular (Valenti *et al.*, 2001).

Como aspectos morfológicos e de proliferação celular mostraram similaridade entre os dois tipos de fibroblastos estudados, passamos a analisar a expressão gênica diferencial entre eles.

Identificamos numerosas alterações gênicas em fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico quando os transcritos foram comparados quantitativamente com os presentes em fibroblastos obtidos de doença benigna de mama. Vários membros da família RAB-GTPase (RAB4A, RAB14, RAB3A, RAB27A) localizados nos compartimentos endocíticos e envolvidos no tráfego de proteínas e lípidos de um compartimento a outro e na reciclagem de ligantes de receptor de volta à superfície celular, estão desregulados. Possivelmente, estas alterações resultam em mudanças da localização de proteínas e tráfego alterado na membrana vesicular e exocitose (Chavrier *et al.*, 1990). Recentemente,

outros membros da família RAB foram envolvidos na agressividade do câncer de mama (Cheng *et al.*, 2004). Outros genes envolvidos em tráfego intracelular como *pleckstrin* (PHLDB1) e nexina selecionadora 12 (SNX12, *sorting nexin 12*) e em selecionamento de proteínas vacuolares (VPS24) estão preferencialmente diminuídos.

Genes ligados à regulação do citoesqueleto e transdução do sinal através dos lípidos estão superexpressos em fibroblastos tumorais. Um deles é a CAPZ, membro da família das F-actinas *capping* proteínas, as quais modulam a geração de segundos mensageiros através do ciclo do fosfoinosítídeo (Sun *et al.*, 1995). Outros elementos alterados da via são os fosfatidilinositol (PREXI) e o fosfoinosítídeo 3-quinase. Membros da família das tetraspaninas, TM9SF4 e LOC90139 (*uropalakin*), implicados no tráfego com fosfatidilinositol quinase estão diminuídos.

Genes codificando flotilina 2, identificada como residente nos *rafts* lipídicos, e correspondendo a uma proteína mitocondrial necessária à formação de esteróides e envolvida no transporte lipídico, (STARD3NL), estão superexpressos. Olayioye *et al.*, 2004, identificaram o aumento da expressão deste último gene em diversas linhagens celulares humanas tumorais de mama e o aumento da expressão da proteína foi encontrado em 28 de 79 amostras de câncer de mama primário analisados.

Outros genes diferencialmente expressos codificam proteínas relacionadas à organização do citoesqueleto e motilidade celular, tais como ACTR3 (*actin related protein 3*), ARFGAP3, ARHGDIB (*Rho GDP; dissociation inhibitor*) e CDC42BPA. A maior parte das proteínas Rho são

GTPases e ciclam entre uma forma ativa que interage com alvos *downstream* e a forma inativa com uma conformação GDP, esta variação entre os estados ativo e inativo pode ser importante para o processo de transformação. Proteínas Rho regulam a morfologia celular, estão envolvidas na perda de polaridade epitelial e estimulam a contractibilidade baseada na actomiosina através das Rho quinases (ROKs) e este processo é necessário para a formação de fibras de stress em fibroblastos (Riento *et al.*, 2003). ROKs controlam a formação de fibras por inativação da fosfatase da miosina de cadeia leve e ativando as LIM quinases (Sahai, Marshall, 2002). Diversas GTPases foram encontradas modificadas em neoplasias, incluindo as mamárias, onde verificaram-se altos níveis de RhoA, Rac e Cdc42 enquanto no tecido normal correspondente foram fracamente identificadas ou ainda, nem mesmo detectadas (Fritz *et al.*, 1999).

Genes relacionados a proteínas envolvidas no tráfego subcelular de íons (SLC4A2, SLC34 β 1, SLC35C1, KCNMA1 e ATP6AP2) e transporte tais como membros da família das quinesinas (KIF3C, KIF1B e DOCK10), também são desreguladas, bem como proteínas nucleares (NUP133) e exportinas (XPO5). A exportação de transdutores de sinal do núcleo para o citoplasma é importante para a sua reciclagem em sucessivas etapas de ativação e desativação. Isso torna o processo de sinalização dependente de uma estimulação sustentada dos receptores e permite a disposição dos mensageiros quando termina o sinal de transdução. A família das quinesinas está envolvida no processo de transporte de organelas (essencial para morfogênese e o funcionamento celular adequado), de proteínas complexas,

de mRNAs e participam também, dos movimentos dos cromossomos e dos fusos durante os processos de mitose e meiose (Miki *et al.*, 2001)

A sinalização via receptores de proteína quinase é terminada por marcação dos receptores ativos para ubiquitinação através de proteínas adaptadoras que contém um domínio dedo de zinco. Este fato os torna alvos para degradação pelo proteasoma 26 (PSMD7), o qual está aumentado em fibroblastos derivados de tecido mamário neoplásico. Algumas enzimas ligadas ao recrutamento da ubiquitinação estão sub expressas nestes fibroblastos tais como, UBPH, UBE2A, e SAE1, um número menor do tipo *ring* está superexpresso RNF20, RNF11, RNF141, assim como, UBE2B, indicando a possível manutenção de receptores em estado ativo.

Vários fatores de crescimento, tais como, IL15, o substrato do receptor de insulina (LOC55971), o oncogene de sarcoma felino (FES) e o PDGFC, tiveram sua expressão regulada positivamente. IL15 foi relacionada à progressão tumoral, regulando a expressão de metaloproteases e VEGFs (Ripley *et al.*, 2004). Entretanto, trabalhos prévios identificaram a produção de IGF-I e IGF-II como contribuindo aos efeitos mitogênicos dos fibroblastos, tornando IGF-II um candidato potencial para mediar as interações epitélio-mesênquima. Em algumas culturas de fibroblastos, níveis altos de IGF-II foram encontrados, embora, os resultados nem sempre fossem confirmados (Sadlonova *et al.*, 2004). Em contrapartida, não observamos aumento na expressão gênica de IGF.

Interessantemente, a glutamina sintetase (GLUL) é um dos genes que foi regulado positivamente (> 5 vezes) e que tem se mostrado

superexpresso em câncer de mama (Porter *et al.*, 2001), indicando alterações metabólicas em câncer de mama. Glutamina sintetase pode ser induzida por hipóxia ou diminuição dos níveis de glutamina, sugerindo que o microambiente pode alterar o *uptake* de nutrientes específicos (Pawlik *et al.*, 2000). Hipoxia é comum em neoplasias e induz vários fatores de crescimento que promovem proliferação incluindo PDGFB, IGFII (Harris *et al.*, 2002). Um dos componentes centrais da translocação do retículo endoplasmático, as proteínas do complexo SEC, que são partículas sinalizadoras, podem ser induzidas por hipóxia. De acordo, SCFD1 (*sec1 family domain containing*) está aumentada em fibroblastos tumorais.

Verificamos que o gene CELSR2 [*cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 (flamingo homolog, Drosophila)*] apresentou expressão diminuída em fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico. Este gene está localizado no cromossomo 1, mapeado na região 1p21. Em drosófila, Flamingo (Fmi) é um receptor transmembrânico conservado, da superfamília das caderinas, que desempenha diversos papéis no processo de remodelamento neuronal e na polaridade de células planares epiteliais (Chae *et al.*, 1999). A proteína codificada por ele faz parte da subfamília flamingo, que consiste de caderinas “não clássicas”, uma subpopulação que não interage com cateninas (ao contrário das caderinas do tipo clássicas). Estão localizadas na membrana plasmática, possuem nove domínios caderina, sete domínios *epidermal growth factor like repeats (EGF-like)* e dois *repeats* laminina tipo A. Acredita-se que estas proteínas sejam receptores envolvidos no contato celular, mediando a comunicação com

domínios caderina, agindo como ligantes de regiões homofílicas e domínios *EGF-like*, envolvidos na adesão celular e em interações receptor-ligante.

BAMBI é uma glicoproteína transmembrânica relacionada aos receptores tipo I do TGF β e funciona como um regulador negativo da sinalização do TGF β , contribuindo para a tumorigênese (Sekya *et al.*, 2004) Encontramos esse gene expresso mais freqüentemente em fibroblastos derivados de tecido mamário neoplásico do que em não neoplásicos (2.6 vezes).

Encontramos a expressão alterada de várias ribonúcleo-proteínas (HNRPH3, HNRPU e HNRPF) que podem contribuir para modificações de tipos de processamento de mRNAs e manutenção de telômeros. Modulação de genes codificando proteínas envolvidas no controle da síntese e transporte dos ácidos nucléicos tais como RNA polimerase II e proteínas dos dedos de ZN foram observadas.

Muitos dos genes preferencialmente desregulados correspondem a genes não caracterizados incluindo vários “*chromosome open reading frame*” e proteínas hipotéticas.

Em conclusão, nossos dados propõem que fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico apresentam desregulação quantitativa de proteínas vinculadas ao tráfego de membrana e reciclagem vesicular e tráfego subcelular de lípidos envolvendo transporte de íons e enzimas ligadas a ubiquitina e a regulação do citoesqueleto.

Durante a introdução deste trabalho, várias evidências foram apresentadas de que anormalidades no estroma contribuem para a

progressão tumoral. Estudos anteriores demonstraram também que modelos xenográficos com células humanas epiteliais prostáticas normais com fibroblastos associados ao carcinoma não resultaram em total tumorigenicidade, sugerindo uma sinalização recíproca entre as células (Olumi *et al.*, 1999).

Após analisar a expressão gênica diferencial entre fibroblastos originários de tecido tumoral de mama daqueles originados a partir de doença benigna de mama, passamos a questionar qual seria o papel de uma célula epitelial mamária normal na expressão gênica de um fibroblasto associado ao carcinoma. Para tanto, realizamos co-culturas entre fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico e células epiteliais mamárias normais, MCF10A, como descrito em métodos. Verificamos a desregulação de vários genes envolvidos em importantes processos fisiológicos, como adesão celular, sinalização celular e apoptose.

As moléculas responsáveis pela adesão celular, integrinas, são fundamentais em numerosas funções celulares, incluindo ancoragem, diferenciação e proliferação (Berry *et al.*, 2004). Encontramos o gene integrina $\beta 6$ regulado negativamente após a co-cultura com MCF10A, indicando uma diminuição na sinalização para proliferação celular. Esta sinalização pode ocorrer através da via Ha-ras, onde outro elemento desta via, o SHC (*src homology 2 domain containing transforming protein C3*), também teve sua regulação diminuída em fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico após co-cultura com MCF10A.

As MAP quinases atuam como ponto múltiplo de integração de sinais bioquímicos e estão envolvidas em uma diversa variedade de processos celulares como, proliferação, diferenciação e regulação da transcrição. Genes relacionados à cascata de sinalização celular via MAPK também se mostraram com regulação alterada. Dessa forma, embora PDGFC, o qual mostrou-se fracamente regulado positivamente, seja um fator mitogênico para células de origem mesenquimal, encontramos três elementos dessa via regulados negativamente, MAP2K3, MAPK13 e ELK1, sugerindo que a célula epitelial esteja enviando uma mensagem de diminuição na proliferação para o fibroblasto tumoral.

A família das metaloproteinases de matriz está associada a processos fisiológicos e patológicos relacionados ao remodelamento da matriz como aqueles que ocorrem no desenvolvimento embrionário, reparo de tecido e progressão tumoral. Verificamos expressão aumentada de MMP24 (MT5-MMP), uma metaloproteinase de membrana, a qual se localiza na região 20q11.2, frequentemente amplificada em diversos tipos de tumores, incluindo o de mama (Llano *et al.*, 1999). Este achado, embora intrigante, vai de encontro àquele proposto por Singer *et al.*, 2002, que também relatou aumento de outra MMP, a MMP-2 (gelatinase A), após co-cultura com células epiteliais mamárias tumorais. Neste mesmo trabalho, os autores propõem que a expressão de MMP-2 foi restrita ao estroma adjacente às células epiteliais do tumor.

As desintegrinas e metaloproteinases-domínio (ADAMs) formam uma família de glicoproteínas de superfície celular com potencial atividade de

protease e de adesão celular. Le Pabic, *et al.*, 2003 mostraram que *in vivo*, os níveis de ADAM12 são praticamente indetectáveis em fígado normal e tumores benignos e aumentam em carcinomas hepatocelulares (3- e 6-vezes, respectivamente) e metastases de fígado originadas de carcinomas colônicos (40- e 60-vezes, respectivamente). Esta regulação positiva de ADAM12 foi correlacionada com um aumento na atividade e expressão de MMP-2, caracterizando um sinal de agressividade e progressão tumoral. Em nosso modelo de co-cultura, encontramos uma diminuição na expressão do gene ADAM12, quando comparada àquela mostrada por fibroblastos derivados de tecido mamário neoplásico antes da co-cultura. Estes resultados sugerem novamente uma interação de “normalização” dos fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico quando co-cultivados com célula epitelial mamária normal.

O gene CSE1L/CAS foi anteriormente relacionado tanto à apoptose quanto à proliferação celular, uma vez que sua depleção levou à parada do ciclo celular. Encontramos este gene com regulação negativa de sua expressão em fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico após co-cultura. É interessante notar que este gene também se localiza na região cromossômica 20q13, como mencionada anteriormente, amplificada em câncer de mama. Este gene está também relacionado ao tráfego do núcleo para o citoplasma de importina α , a qual é necessária para o transporte nuclear de várias proteínas ativadoras de proliferação, fatores de transcrição, produtos de oncogenes e de genes supressores de tumor como p53 e BRCA1 (Behrens *et al.*, 2003), podendo ser este outro mecanismo

alternativo da possível “normalização” do fibroblasto originário de tecido mamário neoplásico pós contato com a MCF10A.

Ainda avaliando a influência da célula epitelial mamária nos fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico, encontramos dois genes relacionados a via de TGF β com expressão desregulada, TGF β 1, o qual apresentou regulação negativa, e TIEG, (*TGF beta inducible early gene*), que em contraste, apresentou regulação positiva. Enquanto o primeiro pode enviar mensagem de angiogênese e neogênese de matriz extracelular, o segundo pode agir como gene supressor de tumor, desempenhando significativo papel em câncer de mama, uma vez que a expressão de RNAm deste gene foi menor em tumores invasivos e não invasivos quando comparados ao tecido mamário normal (Reinholtz *et al.*, 2004).

Outros genes ligados à via de apoptose/sobrevivência, tais como, AKT, BCL2L1, TRAF3, FAIM2 e Calpaína, tiveram sua regulação alterada. AKT, cujo segundo mensageiro pertence à via do inositolfosfato, e BCL2L1 sinalizam para sobrevivência e apresentaram sua regulação diminuída. Entretanto, TRAF3, um membro da família de receptores de fator de necrose tumoral, o qual induz apoptose, também teve sua regulação diminuída. FAIM2 inibe a ação de FAS, inibindo assim a indução de apoptose, teve sua regulação aumentada. Calpaína, o qual teve sua regulação diminuída, leva à apoptose. Estes dados podem indicar uma resposta do fibroblasto em manter algumas de suas características.

Ao contrário dos achados de Kunz-Schugart, 2001, que obtiveram uma diminuição na expressão de PMP22 (*peripheral myelin protein 22*), cujo produto protéico correlaciona-se com parada de proliferação em G₀, obtivemos um aumento na expressão deste gene. Esta diferença pode residir no fato de que naquele trabalho a interação avaliada foi entre um fibroblasto normal e uma célula epitelial tumoral, no nosso caso, avaliamos a interação entre um fibroblasto tumoral e uma célula epitelial normal, onde se espera encontrar este tipo de mensagem sendo enviada da célula normal para a tumoral.

Em um trabalho utilizando-se da tecnologia de SAGE para identificar genes diferencialmente expressos em diferentes tipos celulares que compõem o tumor *in situ*, mostrou-se a expressão elevada das quimiocinas 14 (CXCL14) e 12 (CXCL12) em células mioepiteliais tumorais e miofibroblastos, respectivamente. Como estas proteínas ligam-se a receptores em células epiteliais aumentando sua proliferação, migração e invasão, podem desempenhar um papel na tumorigênese mamária agindo como fatores parácrinos (Allinen *et al.*, 2004). Encontramos um gene cujo produto codifica uma proteína ligante de quimiocina, CX3CL, a qual é expressa como proteína transmembranica podendo ligar-se ao seu receptor, CX3CR1, presente em células circulantes e, dessa maneira, enviar sinais para metástases (Shulby *et al.*, 2004). A expressão deste gene estava regulada negativamente em fibroblastos derivados de tecido mamário neoplásico quando comparados com aqueles originários de doença benigna.

Nesse sentido, Allinen e colaboradores, 2004, detectaram a expressão deste ligante em miofibroblastos originários de carcinoma ductal *in situ*.

Alguns genes encontrados diferencialmente expressos deverão, futuramente, ser validados por PCR em tempo real e utilizados em ensaios funcionais, para um melhor entendimento da interação epitélio-mesênquima e sua importância na progressão tumoral mamária.

Devido ao grande enfoque dado às células epiteliais mamárias durante a progressão tumoral, a maior parte de tratamentos terapêuticos destina-se a estas células, as quais, graças a sua inerente instabilidade genética adquirem resistência às drogas utilizadas. Uma das vantagens em ter como alvo molecular células estromais é justamente o fato de que estas células são geneticamente estáveis e, portanto, menos susceptíveis a desenvolver resistência a drogas. Deste modo, trabalhos que resultem em genes que possam ser alvos moleculares para futuros tratamentos terapêuticos resultam em possíveis caminhos para a clínica médica.

6 Conclusões

1. Foi possível estabelecer a cultura primária de fibroblastos originários de tecido mamário não-neoplásico e neoplásico, uma vez que ensaios de imunocitoquímica confirmaram a homogeneidade destas células em cultura.
 2. A análise gênica diferencial entre fibroblastos provenientes de tecido mamário não-neoplásico e fibroblastos provenientes de tecido mamário neoplásico indica que há uma desregulação gênica nos fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico, sugerindo que no processo de transformação há diminuição de expressão de determinados genes. Estes genes estão principalmente relacionados ao tráfego de membrana e reciclagem vesicular e, ainda, ao tráfego subcelular de lípidos envolvendo transporte de íons e enzimas ligadas a ubiquitina e a regulação do citoesqueleto.
 3. A influência da célula epitelial mamária normal, MCF10A, pôde ser verificada na expressão gênica dos fibroblastos originários de tecido mamário neoplásico, onde vários genes encontraram-se regulados negativamente ou super-regulados. Esta desregulação parece estar associada a expressão de genes relacionados com a proliferação celular, adesão, apoptose e sobrevivência.
-

7 Referências Bibliográficas

Allinen M., Beroukhim R., Cai L., Brennan C., Lahti-Domenici J., Huang H., Porter D., Hu M., Chin L., Richardson A., Schnitt S., Sellers W.R., Polyak K. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*. 2004;6(1):17-32.

Basset P., Bellocq J.P., Wolf C., Stoll I., Huttin P., Limacher J.M., Podhajcer O.L., Chenard M.P., Rio M.C., Chambon P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*. 1990; 348:669-704.

Barcellos-Hoff M., Ravani S.A. Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. *Cancer Research*. 2000; 60:1254-60.

Behrens P., Brinkmann U., Wellmann A. CSE1L/CAS: its role in proliferation and apoptosis. *Apoptosis*. 2003;8(1):39-44.

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

Berry M.G., Gui G.P., Wells C.A., Carpenter R. Integrin expression and survival in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2004;30(5):484-9.

Bhowmick N.A., Chytil A., Plieth D., Gorska A.E., Dumont N., Shappell S., Washington M.K., Neilson E.G., Moses H.L. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science*. 2004;303(5659):848-51.

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

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

Camps J.L., Chang S.-M., Hsu T.C., Freeman M.R., Hong S.-J., Zhau H.E., von Eschenbach A.C., Chung L.W.K. Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990;87:75-9.

Chae J., Kim M.J., Goo J.H., Collier S., Gubb D., Charlton J., Adler P.N., Park W.J. The Drosophila tissue polarity gene starry night encodes a member of the protocadherin family. *Development*. 1999;126(23):5421-9.

Chavrier P., Parton R.G., Hauri H.P., Simons K., Zerial M. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*. 1990;62(2):317-29.

Cheng K.W., Lahad J.P., Kuo W.L., Lapuk A., Yamada K., Auersperg N., Liu J., Smith-McCune K., Lu K.H., Fishman D., Gray J.W., Mills G.B. The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nat Med*. 2004;10(11):1251-6.

Cheung V.G., Marley M., Aguilar F., Massimi A., Kucherlapati R., Childs G. Making and reading microarrays. *Nat. Genet*. 1999;21:15-9.

Darcy K.M., Zangani D., Shea-Eaton W., Shoemaker S.F., Lee P.P., Mead .LH., Mudipalli A., Megan R., Ip M.M. Mammary fibroblasts stimulate growth, alveolar morphogenesis, and functional differentiation of normal rat mammary epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2000;36(9):578-92.

Deb S., Amin S., Imir A.G., Yilmaz M.B., Suzuki T., Sasano H., Bulun S.E. Estrogen regulates expression of tumor necrosis factor receptors in breast adipose fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(8):4018-24

Dublin E., Hanby A., Patel N.K., Liebman R., Barnes D. Immunohistochemical expression has strong associations with tumor pathology. *Am. J. Pathol.* 2000;157: 1219-27.

Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J.M. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* 1999;21(1 Suppl):10-4.

Duffy M.J., O'Grady P., Devaney D., O'Siorai L., Fennelly J.J., Lijnen H.J. Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas: preliminary report. *Cancer.* 1988;62:531-3.

Dvorak H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New Engl. J. Med.* 1986;315:1650-9.

Edwards J.G., McLaren J., Jones J.L., Waller D.A., O'Byrne K.J. Matrix metalloproteinases 2 and 9 (gelatinases A and B) expression in malignant mesothelioma and benign pleura. *Br J Cancer.* 2003;88(10):1553-9.

Elenbaas B., Weinberg R.A. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Experimental Cell Research.* 2001; 264: 169-84.

Fidler I.J. Molecular Biology of Cancer: Invasion and Metastasis. In: Cancer Principles & Practice of Oncology. Editors: DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. Volume 1, 5th edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York, 1997.

Fukino K., Shen L., Matsumoto S., Morrison C.D., Mutter G.L., Eng C. Combined total genome loss of heterozygosity scan of breast cancer stroma and epithelium reveals multiplicity of stromal targets. *Cancer Res.* 2004;64(20):7231-6.

Fritz G., Just I., Kaina B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer.* 1999;81(5):682-7.

Gache C., Berthois Y., Cvitkovic E., Martin P.M., Saez S. Differential regulation of normal and tumoral breast epithelial cell growth by fibroblasts and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Breast Cancer Res. Treat.* 1999;55:29-39.

Gold L.I. The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog.* 1999;10(4):303-60.

Harris A.L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(1):38-47.

Haslam S.Z., Woodward T.L. Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-cell-stromal-cell interactions and steroid hormone action in normal and cancerous mammary gland. *Breast Cancer Res.* 2003;5(4): 208-15.

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

Jessani N., Humphrey M., McDonald W.H., Niessen S., Masuda K., Gangadharan B., Yates J.R. 3rd, Mueller B.M., Cravatt B.F. Carcinoma and stromal enzyme

activity profiles associated with breast tumor growth in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(38):13756-61.

Jones J.L., Shaw J.A., Pringle J.H., Walker R.A. Primary breast myoepithelial cells exert an invasion-suppressor effect on breast cancer cells via paracrine down-regulation of MMP expression in fibroblasts and tumour cells. J Pathol. 2003;201(4):562-72.

Kunz-Schughart L.A., Heyder P., Schroeder J., Knuechel R. A heterologous 3-D coculture model of breast tumor cells and fibroblasts to study tumor-associated fibroblast differentiation. Experimen. Cell Res. 2001;66:74-86.

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

Le Pabic H., Bonnier D., Wewer U.M., Coutand A., Musso O., Baffet G., Clement B., Theret N. ADAM12 in human liver cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodeling. Hepatology. 2003;37(5):1056-66.

Lin C., Bissel M. Multifaceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. FASEB J. 1993;7:737-43.

Look M.P., Foekens J.A. Clinical relevance of the urokinase plasminogen activator system in breast cancer. APMIS. 1999;107:150-9.

Llano E., Pendas A.M., Freije J.P., Nakano A., Knauper V., Murphy G., Lopez-Otin C. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. Cancer Res. 1999;59(11):2570-6.

Maeda T., Alexander C.M., Friedl A. Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64(2):612-21.

Menashi S., Serova M., Ma L., Vignot S., Mourah S., Calvo F. Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 2003;63(22):7575-80.

Miki H., Setou M., Kaneshiro K., Hirokawa N. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(13):7004-11.

Monni O., Barlund M., Mousses S., Kononen J., Sauter G., Heiskanen M., Paavola P., Avela K., Chen Y., Bittner M.L., Kallioniemi A. Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001;98(10):5711-6.

Monteagudo C., Merino M.J., San-Juan J., Liotta L.A., Stetler-Stevenson W.G. Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue. *Am. J. Pathol.* 1990;136:585-92.

Mueller M.M., Fusenig N.E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(11):839-49.

Nathanson K.N., Wooster R., Weber B.L. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat. Med.* 2001;7(5):552-6.

Nielsen B.S., Sehested M., Timshel S., Pyke C., Dano K. Messenger RNA for urokinase plasminogen activator is expressed in myofibroblasts adjacent to cancer cells in human breast cancer. *Lab. Invest.* 1996;74: 168-77.

Olayioye M.A., Hoffmann P., Pomorski T., Armes J., Simpson R.J., Kemp B.E., Lindeman G.J., Visvader J.E. The phosphoprotein StarD10 is overexpressed in breast cancer and cooperates with ErbB receptors in cellular transformation. *Cancer Res.* 2004;64(10):3538-44.

Olumi A.F., Grossfeld G.D., Hayward S.W., Carroll P.R., Tlsty T.D., Cunha G.R. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* 1999;59(19):5002-11.

Pawlik T.M., Souba W.W., Sweeney T.J., Bode B.P. Amino acid uptake and regulation in multicellular hepatoma spheroids. *J Surg Res.* 2000;91(1):15-25.

Pacheco M.M., Nishimoto I.N., Mourão Neto, M., Mantovani E.B., Brentani M.M. Prognostic significance of the combined expression of matrix metalloproteinase-9, urokinase type plasminogen activator and its receptor in breast cancer as measured by Northern blot analysis. *Int. J. Biol. Markers* 2001;16(1):62-8.

Pacheco M.M., Mourão M., Mantovani E.B., Nishimoto I.N., Brentani M.M. Expression of gelatinases A and B, stromelysin-3 and matrilysin genes in breast carcinomas: clinico-pathological correlations. *Clin. Exp. Metastasis.* 1998;16:577-85.

Peyrat J-P., Vanlemmens L., Fournier J., Huet G., Révillion F., Bonnetterre J. Prognostic value of p53 and urokinase-type plasminogen activator in node-negative human breast cancers. *Clin Cancer Res.* 1998 ;4:189-96.

Polette M., Gilbert N., Stas I., Nawrocki B., Noël A., Remacle A., Stetler-Stevenson W.G., Birembaut P., Foidart M. Gelatinase A expression and localization in human breast cancers. An in situ hybridization study and immunohistochemical detection using confocal microscopy. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 1994;424:641-45.

Polette M., Clavel C., Cockett M., Girod de Bentzmann S., Murphy G., Birembaut P. Detection and localization of mRNAs encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human breast pathology. *Invasion Metastasis*. 1993;13:31-7.

Porter D.A., Krop I.E., Nasser S., Sgroi D., Kaelin C.M., Marks J.R., Riggins G., Polyak K. A SAGE (serial analysis of gene expression) view of breast tumor progression. *Cancer Res*. 2001;61(15):5697-702.

Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet*. 2001;2(6):418-27.

Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet*. 2002;32 Suppl:496-501.

Reinholz M.M., An M,W,, Johnsen S.A., Subramaniam M., Suman V.J., Ingle J.N., Roche P.C., Spelsberg T.C. Differential gene expression of TGF beta inducible early gene (TIEG), Smad7, Smad2 and Bard1 in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;86(1):75-88.

Riento K., Guasch R.M., Garg R., Jin B., Ridley ^aJ. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol*. 2003;23(12):4219-29.

Ripley D., Shoup B., Majewski A., Chegini N. Differential expression of interleukins IL-13 and IL-15 in normal ovarian tissue and ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol*. 2004;92(3):761-8.

Rossi L., Reverberi D., Podesta G., Lastraioli S., Corvo R. Co-culture with human fibroblasts increases the radiosensitivity of MCF-7 mammary carcinoma cells in collagen gels. *Int. J. Cancer*. 2000;85:667-73.

Rouyer N., Wolf C., Chenard M.P., Rio M.C., Chambon P., Bellocq J.P., Basset P. Stromelysin-3 gene expression in human cancer: an overview. *Invasion/Metast.* 1994-1995;14:269-75.

Sahai E., Marshall C.J. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(2):133-42.

Sekiya T., Adachi S., Kohu K., Yamada T., Higuchi O., Furukawa Y., Nakamura Y., Nakamura T., Tashiro K., Kuhara S., Ohwada S., Akiyama T. Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells. *J Biol Chem.* 2004;279(8):6840-6.

Selvey S., Haupt L.M., Thompson E.W., Matthaei K.I., Irving M.G., Griffiths L.R. Stimulation of MMP-11 (stromelysin-3) expression in mouse fibroblasts by cytokines, collagen and co-culture with human breast cancer cell lines. *BMC Cancer.* 2004;4(1):40.

Seidl P., Huettinger R., Knuechel R., Kunz-Schughart L.A. Three-dimensional fibroblast-tumor cell interaction causes downregulation of RACK1 mRNA expression in breast cancer cells in vitro. *Int J Cancer.* 2002;102(2):129-36.

Shaw L.M. Integrin function in breast carcinoma progression. *J. Mam. Gland Biol. Neopl.* 1999;4:367-76.

Shekhar M.P.V., Wrdell J., Santner S.J., Pauley R.J., Tait L. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: Implications for tumor development and progression. *Cancer Research.* 2001;61:1320-6.

Shulby S.A., Dolloff N.G., Stearns M.E., Meucci O., Fatatis A. CX3CR1-fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration, and survival of human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64(14):4693-8.

Singer C.F., Kronsteiner N., Marton E., Kubista M., Cullen K.J., Hirtenlehner K., Seifert M., Kubista E. MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;72(1):69-77.

Soini Y., Hurskainen T., Höyhty M., Oikarinen A., Autio-Harminen H. 72KD and 92KD type IV collagenase, type IV collagen, and laminin mRNAs in breast cancer: A study by in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* 1994;42:945-51.

Solomayer E-F., Diel I.J., Wallwiener D., Bode S., Meyberg G., Sillem M., et al. Prognostic relevance of urokinase plasminogen activator detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer. *Br J Cancer.* 1997;76:812-8.

Sadlonova A., Novak Z., Johnson M.R., Bowe D.B., Gault S.R., Page G.P., Thottassery J.V., Welch D.R., Frost A.R. Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional *in vitro* co-culture. *Breast Cancer Res.* 2005, 7:R46-R59.

Tryggvason K., Höyhty M., Pyke C. Type IV collagenases in invasive tumors. *Br. Cancer Res Treat.* 1993;24:209-18.

van den Hoff A. Stromal involvement in malignant growth. *Adv. Cancer Res.* 1988;50:159-96.

Valenti M.T., Azzarello G., Balducci E., Sartore S., Sandri M., Manconi R., Sicari U., Bari M., Vinante O. Conditioned medium from MCF-7 cell line induces

myofibroblast differentiation, decreased cell proliferation, and increased apoptosis in cultured normal fibroblasts but not in fibroblasts from malignant breast tissue. *Histochem J.* 2001;33(9-10):499-509.

Volgestein B., Kinzler K. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993;9:138-41.

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

Wang C.S., Tetu B. Stromelysin-3 expression by mammary tumor-associated fibroblasts under in vitro breast cancer cell induction. *Int J Cancer.* 2002;99(6):792-9.

Wang C.S., Goulet F., Auger F., Tremblay N., Germain L., Tetu B. Production of bioengineered cancer tissue constructs in vitro: epithelium-mesenchyme heterotypic interactions. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2001;37:434-39.

Wang E., Miller L.D., Ohnmacht G.A., Liu E.T., Marincola F.M. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol.* 2000;18(4):457-9.

Wiseman B.S., Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science.* 2002;296(5570):1046-9.

Wolf C., Rouyer N., Lutz Y., Adida C., Lorient M., Bellocq J.P., Chambon p., Basset P. Stromelysin 3 belongs to a subgroup of proteinases expressed in breast carcinoma fibroblastic cells and possibly implicated in tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90:1843-7.
