

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

**ALINE RAMOS MAIA LOBBA**

**Presença de marcadores de células-tronco  
em linhagens celulares humanas de câncer  
de mama: possível valor em diagnóstico,  
prognóstico e terapia**

**Versão corrigida da Tese defendida**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

21/02/2014

**ALINE RAMOS MAIA LOBBA**

**Presença de marcadores de células-tronco  
em linhagens celulares humanas de câncer  
de mama: possível valor em diagnóstico,  
prognóstico e terapia**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Doutor em  
Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

São Paulo

2014

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Lobba, Aline Ramos Maia

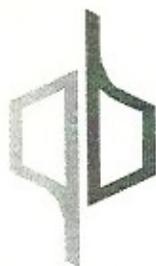
L796p      Presença de marcadores de células-tronco em linhagens celulares humanas de câncer de mama : possível valor em diagnóstico, prognóstico e terapia / Aline Ramos Maia Lobba. -- São Paulo, 2014.  
154p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Biquímica.

Orientador: Sogayar, Mari Cleide

1. Biologia celular 2. Biologia molecular I. T. II. Sogayar, Mari Cleide, orientador.

574.87 CDD



ATA. Julgamento da Tese de Doutorado em **Bioquímica** de **ALINE RAMOS MAIA LOBBA**. Ao vigésimo oitavo dia do mês de abril do ano de dois mil e quatorze, às treze horas e trinta minutos, na sala 0662 "Anfiteatro Vermelho" bloco 06 superior deste Instituto, instalou-se a Comissão Julgadora da Tese de Doutorado intitulada "**Presença de marcadores de células-tronco em linhagens celulares humanas de câncer de mama: possível valor em diagnóstico, prognóstico e terapia**", para a obtenção do título de Doutora em Ciências – Área: Bioquímica, apresentada por **ALINE RAMOS MAIA LOBBA**, cujos estudos pós-graduados visando o doutorado iniciaram-se em fevereiro de dois mil e oito, neste Instituto de Química. A Comissão Julgadora indicada nos termos do artigo 102 do Regimento Geral da Universidade de São Paulo constituiu dos Professores Doutores: Mari Cleide Sogayar (Orientadora e Presidente), Eduardo Moraes Rego Reis (Instituto de Química - USP), Deborah Schechtman (Instituto de Química - USP), Maria Mitzi Brentani (Faculdade de Medicina - USP) e Nathalie Cella (Instituto de Ciências Biomédicas - USP). Verificado o cumprimento das exigências regulamentares, a Comissão Julgadora passou a argüir a candidata na seguinte ordem: Professores Doutores: Nathalie Cella, Maria Mitzi Brentani, Deborah Schechtman, Eduardo Moraes Rego Reis e Mari Cleide Sogayar. Concluídas as argüições, a Comissão Julgadora em sessão secreta, atribuiu os seguintes conceitos: Professores Doutores: Nathalie Cella (Aprovada), Maria Mitzi Brentani (Aprovada), Deborah Schechtman (Aprovada), Eduardo Moraes Rego Reis (Aprovada) e Mari Cleide Sogayar (Aprovada). Em conclusão, a candidata foi considerada **Aprovada**. Em seguida, a Comissão Julgadora elaborou relatório a ser encaminhado à Comissão de Pós-Graduação. Reaberta a sessão, a Senhora Presidente anunciou os resultados e deu por encerrados os trabalhos. E para constar eu, Cibele Rosani Carlos *Cibele Rosani Carlos* Secretária da Pós-Graduação, lavrei a presente Ata que vai datada e assinada pelos membros examinadores. São Paulo, 28 de abril de 2014.

*Nathalie Cella*

**Profa. Dra. Nathalie Cella**

*Maria Mitzi Brentani*

**Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani**

*Deborah Schechtman*

**Profa. Dra. Deborah Schechtman**

*Eduardo Moraes Rego Reis*

**Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis**

*Mari Cleide Sogayar*

**Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar**

*Ao meu pai e minha mãe (em memória), pela dedicação incondicional.*

*Ao Fabrizio, principal responsável por esta conquista.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Mari Cleide Sogayar por toda orientação e ensinamentos. Obrigada pela oportunidade neste primeiro passo da carreira científica e por toda atenção nos principais momentos desta etapa.

À Professora Pranela Rameshwar por ter me recebido no seu laboratório na Rutgers New Jersey Medical School. Obrigada pela orientação, discussões e sugestões científicas que contribuíram muito para o desenvolvimento da segunda parte deste projeto.

À Professora Letícia Labriola pelas discussões científicas e críticas que contribuíram para o amadurecimento do projeto.

À Dra. Ana Claudia Carreira, pelas discussões científicas, pelo apoio dentro e fora do laboratório e por estar sempre perto solucionando todos os tipos de problemas. Obrigada pela amizade nas horas difíceis e pela paciência durante todos os estes anos.

Ao Dr. Marcos Demasi, pela ajuda intelectual e soluções brilhantes tanto na parte científica como nas questões logísticas da rotina diária do laboratório.

À Zizi, Débora, Ricardo e Sandra pelo apoio técnico, trabalho e dedicação.

À Marluce pela dedicação sem fim para solucionar problemas burocráticos, administrativos e organizacionais do laboratório. Também preciso agradecer por todos os doces, pães e quitutes de suas máquinas mágicas

Aos alunos de iniciação científica, Caio e Tatiene, que me ensinaram e me ajudaram muito. Sem eles não seria possível realizar este projeto.

A todos os amigos do laboratório por toda ajuda no dia-a-dia, pelos momentos de descontração e das mais diversas confusões que renderam boas risadas. Agradeço a Nanda pela amizade, conselhos, almoços, discussões científicas e por toda ajuda para desenvolver o projeto. Também agradeço por ter me emprestado sua maravilhosa filha para ser minha dama de honra. Agradeço ao Gustavo por ter me feito rir tanto nos últimos anos. À Ana Lúcia, Letícia e Roberta por me entenderem tão bem. À Marina, pela amizade e por compartilhar o bom humor para lidar com as nossas doenças autoimunes. A Tati, pela amizade, risadas e por seus conselhos que me fizeram refletir em ser um pessoa melhor. A todos os membros da Unidade de Ilhotas pela ajuda e distrações nas horas vagas.

Agradeço aos meus amigos e irmãos de coração, Letícia e Bruno. Obrigada pela grande amizade, pelos jogos de fim de semana, por todas as conversas e conselhos. Obrigada pela força em todos os momentos difíceis e por todo carinho. Obrigada por todos os momentos simples e divertidos que fizeram e fazem os nossos dias melhores. Obrigado por terem aceitado a fazer parte da minha família e estarem presente nessa nova fase (aventura) que temos pela frente.

Agradeço a minha família por todo incentivo e carinho. Ao meu pai, Edson Rodrigues, e minha mãe, Vera Lúcia (em memória), que lutaram muito para dar todo apoio que sempre precisei. Obrigada por todo amor, carinho e dedicação que recebi durante toda minha vida. Obrigada por serem meus exemplos de vida. Agradeço ao meu irmão, Ellison Maia, por estarmos sempre juntos seja brincando, brigando, consolando ou apenas conversando. Obrigada por estar ao meu lado e me forçar a pensar diferente. Agradeço as minhas tias, Leca e Iraci, que sempre cuidaram de mim com todo carinho e amor de mãe. Obrigada a todos vocês por formarem uma família maravilhosa. Agradeço também a minha segunda família, Gastone Lobba e Regina Lobba, por toda atenção e carinho. Obrigada Regina e Gastone por me acolherem como uma filha e estarem sempre ao meu lado dando suporte e amor. Obrigada por estarem presente nesses últimos anos ajudando em todas as conquistas. Também agradeço a minha tia Edna, tio Deda e meus primos André e Jack por me acolherem tão bem e me ajudarem superar a distância da minha família. Obrigada pelo amor, carinho e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Obrigada Edna por ser minha Mãezona e me fazer mais feliz. Obrigada por cada cafézinho acolhedor da tarde que me deram força para continuar.

Por fim agradeço ao Fabrizio, meu marido, meu grande amor, amigo e companheiro por estar ao meu lado incondicionalmente nos últimos 13 anos. Obrigada por me fazer superar todos os momentos difíceis que passei, por me fazer aguentar quando achei que não conseguiria e por me compreender tão bem. Obrigada por me fazer tão feliz. Obrigada por ser meu companheiro nessa nossa etapa de realizações.

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro.

*“Even the smallest person can change the course of the future”*

Lady Galadriel (The Lord of the Rings)

## Resumo

Lobba, A.R.M. **Presença de marcadores de células-tronco em linhagens celulares humanas de câncer de mama: possível valor em diagnóstico, prognóstico e terapia.** 2014. 153p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo

O câncer de mama é a doença maligna que mais acomete as mulheres no mundo. Apesar dos inúmeros tratamentos, o óbito se deve principalmente à doença metastática que pode se desenvolver a partir do tumor primário. Esta progressão tumoral decorre da dificuldade de se estabelecer um prognóstico mais preciso. Atualmente, a teoria de células iniciadoras de tumor vem sendo estudada para tentar explicar a biologia do câncer e descrever novos alvos para prognósticos e terapias. O carcinoma mamário foi o primeiro tumor sólido para o qual foi identificada uma subpopulação celular, definida como CD44+/CD24-, apresentando as características de células iniciadoras tumorais. Embora este fenótipo venha sendo muito utilizado para descrever as células iniciadoras tumorais de mama, muitos trabalhos tem questionado a relevância clínica desses marcadores, enfatizando que outros marcadores devem ser identificados. Assim, o objetivo deste trabalho é analisar e caracterizar marcadores de células-tronco que possam estar relacionados com o grau de malignidade no modelo de câncer de mama. Inicialmente, analisou-se a expressão de 10 marcadores de células-tronco em diferentes linhagens de câncer de mama que apresentam graus crescentes de malignidade. O CD90 foi selecionado devido à alta expressão desse marcador na linhagem mais agressiva Hs578T. Para a caracterização deste marcador, realizou-se ensaios funcionais, através do

silenciamento do CD90 na linhagem tumorigênica Hs579T e sua superexpressão na linhagem não-tumorigênica MCF10A. As linhagens celulares geradas foram caracterizadas quanto ao crescimento celular, potencial invasivo e metastático. Foi possível observar que houve uma alteração da morfologia nas linhagens transformadas com o CD90 e, também, um maior tempo de dobramento na linhagem Hs578T-CD90- e um menor na MCF10A-CD90+. Além disso, a linhagem MCF10-CD90+ foi capaz de crescer independentemente de EGF. Através da análise da via EGF, foi possível observar que houve um aumento da expressão da forma fosforilada do receptor e dos fatores Erk, c-Jun, e Jnk na linhagem MCF10A-CD90+ e uma diminuição dos mesmos na linhagem Hs578T-CD90-. A análise da atividade do elemento responsivo do fator de transcrição AP1 comprovou que a via de EGF é funcional na linhagem MCF10-CD90+. Também foram analisados os marcadores de transição epitélio-mesenquimal, verificando-se aumento da expressão dos marcadores mesenquimais na linhagem MCF10A-CD90+ e diminuição na linhagem Hs578T-CD90-. Os ensaios *in vitro* de invasão mostraram que as células MCF10-CD90+ são capazes de migrar e invadir e as células Hs578T-CD90- apresentam diminuição significativa da habilidade de migração e invasão. Além disso, os ensaios de metástase *in vitro* e *in vivo*, mostraram que a superexpressão de CD90 levou à malignização das células MCF10A. Por outro lado, a linhagem Hs578T-CD90- apresentou menor potencial metastático *in vitro*. Portanto, neste trabalho, pela primeira vez, o CD90 foi caracterizado funcionalmente como um marcador envolvido na transformação maligna do carcinoma mamário, contribuindo, assim, para melhor entendimento da biologia do câncer de mama e para que se possa desenvolver novas ferramentas de diagnóstico/prognóstico e novos protocolos clínicos e terapêuticos.

Palavras-chave: Câncer de mama, células-tronco, células iniciadoras de tumor, CD90.

## **Abstract**

Lobba, A.R.M. **Analysis of stem cells markers in human breast cancer cell lines.** 2014. 154p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Breast cancer is the malignant disease which affects the highest number of women in the world. In spite of the numerous treatments available, death is primarily due to the metastatic disease that may develop from the primary tumor. This tumor progression occurs because of the difficulty in establishing an accurate diagnosis/prognosis. Currently, the tumor initiating cells theory is being applied in an attempt to explain cancer biology and to unveil new diagnostic and therapeutic targets. Mammary carcinoma was the first solid tumor in which a cellular subpopulation, defined as CD44+/CD24-, was associated with tumor initiating cells. Although this phenotype has been widely used to describe breast tumor initiating cells, several studies have questioned the clinical relevance of these markers, emphasizing that additional markers should be identified. The objective of the present study is to analyze and characterize stem cell markers that may be related to malignancy stages in the breast cancer model. Initially, the expression of 10 stem cell markers was analyzed in different breast cancer cell lines displaying different malignancy grades. CD90 was selected due to its high expression levels in the most aggressive cell line, namely: Hs578T. In order to further characterize this marker, a functional study was performed in which CD90 was silenced in the Hs578T tumorigenic cell line and overexpressed in the non-tumorigenic MCF10A cell line. The resulting cell lines were characterized relative to growth rate and invasive and

metastatic potential. A change in morphology readily was observed in the cell lines overexpressing CD90. In addition, the Hs578T-CD90- cell line presented an increased doubling time (DT), while the MCF10A-CD90+ cell line displayed a lower DT.. Furthermore, MC10-CD90+ cells were able to grow in the absence of EGF. Analysis of components of the EGF pathway revealed increased expression levels of the phosphorylated form of Erk, c-Jun and Jnk receptors in the MCF10-CD90+ cell line, while Hs578T-CD90- cells presented decreased expression of the same factors and receptors. Analysis of the activity of the AP1 responsive element allowed confirmation that the EGF pathway is functional in the MCF10-CD90+. . Epithelial-mesenchymal transition markers presented increased expression levels in the MCF10A-CD90+ cell line, accompanied by decreased expression levels in Hs578T-CD90- cells. *In vitro* invasion assays showed that MCF10A-CD90+ cells are capable of migrating and invading, while Hs578T-CD90- cells presented a significant decrease in their ability to migrate and invade. Additionally, *in vitro* and *in vivo* metastasis assays showed that malignization ensued upon overexpression of CD90 in MCF10A cells and a lower tendency to form metastasis *in vitro* was observed for the Hs578T-CD90- cell line. Therefore, the present study presents, for the first time in the literature, the functional characterization of CD90 as a genetic marker involved in the malignant transformation of mammary carcinoma, leading to a better understanding of the breast cancer biology, which may, in turn, lead to the development of new clinical and therapeutic protocols.

Keywords: breast cancer, stem cells, tumor initiating cells, CD90.

## Lista de abreviaturas e siglas

$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
$\mu\text{m}$	micrometro
%	porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Graus celsius
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (Trifosfato de adenosina)
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Albumina sérica bovina)
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
cm	centímetro
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DP	Desvio Padrão
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
ERK2	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase 2</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)
h	hora

HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HPRT	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase</i> (Hipoxantina Fosforribosil Transferase)
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
kDa	quilodalton
L	litro
mA	miliampere
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
min	minuto
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanograma
nm	nanometro
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> (fosfatidilinositol 3-quinase)
PI3KC3	<i>Class III Phosphatidylinositol 3-kinase</i> (fosfatidilinositol 3-quinase classe III)
PI3P	<i>Phosphatidylinositol 3-phosphate</i> (fosfatidilinositol 3-fosfato)
PKC	<i>Protein Kinase C</i> (Proteína Quinase C)

PKN1	<i>Protein Kinase N1</i> (Proteína Quinase N1)
PM	Peso Molecular
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa)
s	segundo
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i> (Pequenos RNA de Interferência)
U	Unidades
W	Watt
WB	Western Blott

## Lista de figuras

Figura 1: Modelo hipotético de progressão tumoral. ....	23
Figura 2: Modelo hipotético explicando o modelo de células iniciadoras de tumor e da evolução clonal evolução.....	27
Figura 3: Modelo hipotético explicando a origem de células iniciadoras de tumor. ....	29
Figura 4: Modelo Hipotético da hierarquia das células tronco epiteliais mamárias e diferenciação. ....	33
Figura 5: Transição epitélio-mesenquimal e células iniciadoras de tumor na progressão do câncer de mama. ....	37
Figura 6: Análise de qRT-PCR da expressão dos marcadores de células-tronco em linhagens tumorais e não tumorigênica de mama. ....	71
Figura 7: Análise dos marcadores de células tronco na linhagem normal e tumoral de mama. ....	75
Figura 8: Análise dos marcadores CD90 e CD14 nas linhagens tumorais de mama. ....	76
Figura 9: Porcentagem da subpopulação celular nas linhagens de mama.....	77
Figura 10: Amplificação do cDNA de CD90 humano. ....	78
Figura 11: PCR de colônia dos clones obtidos para CD90. ....	79
Figura 12: Células 293-T transfectadas com as construções para produção de partículas lentivirais.....	80
Figura 13: Contagem, por citometria de fluxo, das células 293-T fluorescentes transduzidas com os vetores pLV-eGFP e pLV-eGFP-CD90.....	81
Figura 14: Separação das células MCF10A fluorescentes transduzidas com pLV-eGFP (vetor vazio). ....	84
Figura 15: Separação das células MCF10A fluorescentes transduzidas com pLV-eGFP-CD90 (CD90+).....	87
Figura 16: Análise de Western Blot do CD90 na linhagem MCF10A parental, na transduzida com o vetor pLV-eGFP (vetor vazio) e pLV-eGFP-CD90 (CD90+).....	88
Figura 17: Expressão do RNA mensageiro do marcador CD90 na linhagens Hs578-T transduzidas e na parental. ....	89
Figura 18: Níveis da expressão proteica do marcador CD90 na linhagens Hs578-T transduzidas e na parental. ....	92

Figura 19: Análise de Western Blot do CD90 na linhagem Hs578T parental, transduzida com o non-target e a construção TRCN57025 (CD90-). .....	92
Figura 20: Caracterização das linhagens Hs578-T transduzidas. ....	95
Figura 21: Caracterização das linhagens MCF10A transduzidas. ....	100
Figura 22: Análise da expressão proteica dos fatores presentes na via de sinalização de EGF. ....	102
Figura 23: Análise do elemento responsivo do fator de transcrição AP-1.....	104
Figura 24: Análise da expressão da forma comprimento total e truncada do receptor NK1. ....	106
Figura 25: Análise da expressão proteica dos fatores presentes na via de sinalização de EGF. ....	108
Figura 26: Ensaio de migração e invasão celular em Transwell® utilizando membrana basal reconstituível (Matrigel™). ....	113
Figura 27: Ensaio de formação de colônia em suspensão de agarose.....	115
Figura 28: Ensaios in vivo de metástase em pulmão de rato com as linhagens parentais e transformadas. ....	120

## **Lista de tabelas**

Tabela 1 : Classificação molecular dos subtipos tumorais de mama .....	25
Tabela 2 : Características das Linhagens celulares de mama humanas .....	43
Tabela 3: Anticorpos utilizados para o ensaio de citometria de fluxo.....	45
Tabela 4: Anticorpos primários utilizados para o ensaio de western-blot .....	46
Tabela 5: Anticorpos secundários utilizados para o ensaio de western-blot.....	46
Tabela 6: Sequencia dos oligonucleotideos utilizados nos de ensaios de qRT-PCR .....	49
Tabela 7: Concentração final de primers utilizados nas reações de qRT-PCR .....	68

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1. Câncer de mama .....	21
1.2. Células iniciadoras tumorais.....	26
1.3. Células iniciadoras tumorais no câncer de mama .....	32
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
2.1. Objetivo geral.....	40
2.2. Objetivos específicos.....	40
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1. Plasmídeos.....	41
3.2. Linhagens celulares .....	42
3.3. Soluções e meios de cultura para células de mamíferos .....	43
3.4. Soluções e meios de cultura para bactérias.....	44
3.5. Anticorpos.....	45
3.6. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares humanas.....	46
3.7. Ensaio de RT-PCR Quantitativo .....	47
3.7.1. Extração do RNA total das linhagens celulares.....	47
3.7.2. Síntese da primeira fita do cDNA .....	48
3.7.3. Desenho dos <i>primers</i> .....	48
3.7.4. Reação da RT-PCR quantitativo .....	49
3.7.5. Determinação da concentração final de <i>primers</i> .....	51
3.7.6. Determinação da eficiência dos <i>primers</i> .....	51
3.7.7. Confirmação da expressão diferencial .....	52
3.8. Citometria de fluxo .....	52

3.8.1. Ensaio de citometria de fluxo para caracterização dos marcadores de membrana celular e para análise de células eGFP positivas.....	53
3.8.2. Análise e separação celular de células expressando eGFP .....	54
<b>3.9. Construção do vetor lentiviral pLV-EGFP-CD90 para ensaio de super-expressão</b> .....	<b>54</b>
3.9.1. Desenho dos <i>primers</i> para amplificação da região codificante do CD90 .....	54
3.9.2. Amplificação da região codificante do CD90 .....	55
3.9.3. Clonagem da região codificante do CD90 .....	55
3.9.4. Preparo de bactérias <i>Escherichia coli</i> eletrocompetentes e transformação por eletroporação com DNA plasmideal .....	56
3.9.5. Rastreamento de clones bacterianos por PCR de colônia .....	57
3.9.6. Preparação de DNA plasmideal em pequena e média escala .....	57
3.9.7. Análise da sequência de nucleotídeos .....	58
3.9.8. Sub-clonagem da construção no vetor lentiviral de terceira geração.....	58
<b>3.10. Ensaio funcional</b> .....	<b>58</b>
3.10.1. Produção de partículas lentivirais em células 293-T .....	58
3.10.2. Titulação das partículas lentivirais pLV-EGFP para cálculo do título biológico .	59
3.10.3. Transdução viral da linhagem MCF10-A com as partículas lentivirais pLV-EGFP-CD90.....	60
3.10.4. Transdução viral da linhagem Hs578-T com as partículas lentivirais do sistema <i>Mission shRNA</i> .....	60
3.10.5. Confirmação da superexpressão e da inibição das linhagens transduzidas .....	61
<b>3.11. Caracterização das linhagens geradas</b> .....	<b>61</b>
3.11.1. Ensaio de Western-blot .....	61
3.11.2. Ensaio de gene repórter .....	63
3.11.3. Ensaio de tempo de dobramento.....	64
3.11.4. Ensaio de formação de colônia em meio semi-sólido .....	64

3.11.5. Ensaio de migração e invasão celular <i>in vitro</i> .....	65
3.11.6. Ensaio de metástase experimental em ratos <i>nude</i> .....	66
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
4.1. Análise da expressão de mRNA de marcadores de células-tronco nas linhagens de mama .....	67
4.2. Análise da expressão proteica dos marcadores de células-tronco nas linhagens de mama .....	72
4.3. Análise funcional de CD90 na linhagem normal MCF10-A e na linhagem tumoral Hs578-T .....	78
4.3.1 Superexpressão do marcador CD90 na linhagem MCF10-A .....	78
4.3.2 Inibição do marcador CD90 na linhagem Hs578-T.....	88
4.4. Caracterização das linhagens MCF10-Cd90+ e Hs578T-CD90-.....	93
4.4.1. Morfologia e tempo de dobramento .....	93
4.4.2. Análise da via de sinalização de EGF .....	100
4.4.3. Análise de marcadores tumorais .....	104
4.4.4. Análise <i>in vitro</i> do potencial invasivo das linhagens celulares .....	109
4.4.5. Análise <i>in vitro</i> do potencial metastático das linhagens celulares .....	114
4.4.6. Análise <i>in vivo</i> do potencial metastático das linhagens celulares .....	116
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>121</b>
5.1. Análise dos marcadores de células tronco.....	121
5.2. Caracterização funcional do CD90.....	126
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>133</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>134</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>136</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Câncer de mama**

Câncer é a principal causa de morte no mundo inteiro. De acordo com o projeto da Globocan da Organização Mundial da Saúde, em 2012, foram estimados cerca de 14,1 milhões de novos casos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes no mundo. Segundo estimativas, o número de casos de câncer e óbitos devem aumentar, chegando a 31,4 milhões de novos casos e cerca de 13,2 milhões de mortes no ano de 2030 (Globocan, 2012).

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde e o Instituto Nacional do Câncer, as estimativas para o ano de 2014, também válidas para o ano de 2015, apontam para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer no país. Desse total, espera-se 57 mil novos casos de câncer de mama feminino, com um risco estimado de 56 casos a cada 100 mil mulheres, o que o eleva ao posto de terceiro tipo de câncer mais incidente na população brasileira e o mais comum entre as mulheres (INCA/2014) .

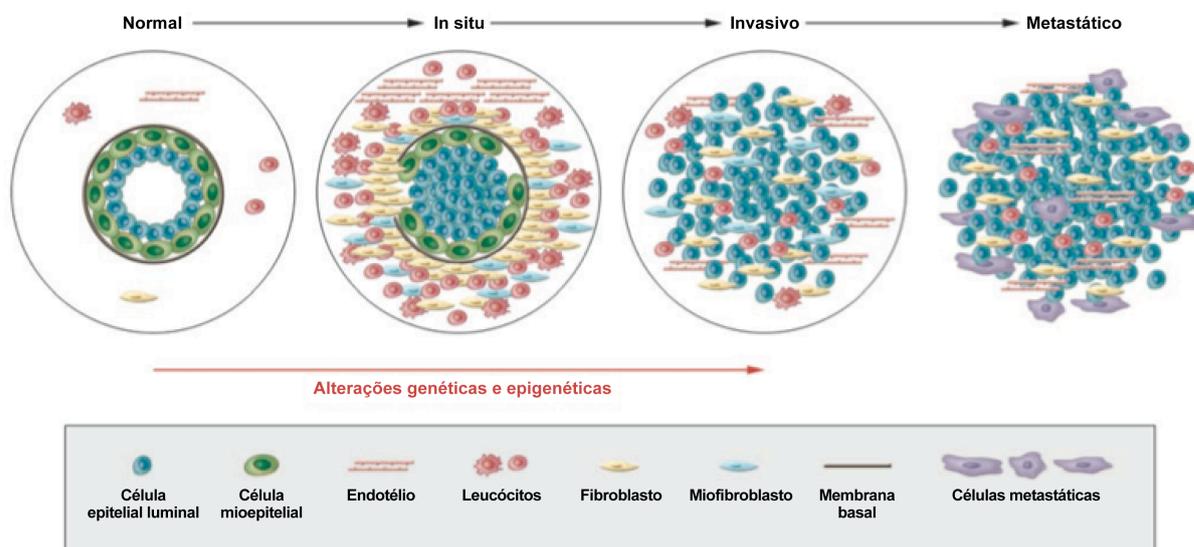
O câncer de mama também é considerado um problema de saúde pública mundial. Segundo dados da Globocan, é a maior causa de morte por câncer nas mulheres em todo o mundo. A estimativa para o ano de 2012, foi de 1,67 milhões de novos casos com cerca de 520 mil mortes, representando aproximadamente 25% de todos os tipos de câncer feminino diagnosticados (Gobocan 2012, IARC). É importante ressaltar que, quando detectado e tratado precocemente, o câncer de mama pode apresentar um bom prognóstico. Em países desenvolvidos, devido a estratégia do diagnóstico precoce, a sobrevida vem aumentando nos últimos 40 anos e, atualmente, é de 85% em cinco anos. Já nos países em desenvolvimento,

como no Brasil, a sobrevida permanece com valores entre 50 e 60%, muito provavelmente devido a doença ainda ser diagnosticadas em estádios mais avançados (INCA, 2014).

O tumor de mama mais comumente detectado entre as mulheres no mundo é o carcinoma mamário, que se origina à partir do epitélio dos ductos das glândulas mamárias. Esta susceptibilidade da glândula à tumorigênese está associada a múltiplas fases de modificações morfológicas, como morfogênese ductal, lactação e involução, que ocorrem durante o desenvolvimento natural feminino. Tais modificações, podem possibilitar alterações nos complexos mecanismos que regulam o modelamento da glândula, resultando, assim, no processo de malignização (Bissel & Radisky, 2001).

Clinicamente, o câncer de mama pode se apresentar de três formas distintas de carcinoma: carcinoma *in situ*, no qual o tumor permanece confinado ao tecido mamário; carcinoma invasivo, no qual as células tumorais podem atravessar os limites teciduais; e carcinoma metastático, no qual as células tumorais migram para órgãos distantes (Allred *et al.*, 2001) (Figura 1). Cerca de 50 à 80% dos carcinomas mamários são classificados como ductal-invasivo (Weigelt *et al.*, 2005). Morfologicamente, estes tipos de tumores são avaliados de acordo com seu grau e tipo histológico, presença de invasão linfo-vascular e metástase para linfonodos. Entretanto, a grande maioria desses tumores caracterizam-se como neoplasias heterogêneas, com vários subtipos patológicos e diferentes aspectos histológicos, além de serem clinicamente diferentes com diversas variações de respostas aos tratamentos (Page *et al.*, 1998; Van Veer *et al.*, 2002; Solier *et al.*, 2003). Desse modo, a classificação morfológica tornou-se insuficiente para caracterizar os carcinomas de mama, principalmente devido a muitos tumores mamários com o

mesmo grau, estadio e tipo histológico possuírem diferentes prognósticos e distintas respostas à terapia.



**Figura 1: Modelo hipotético de progressão tumoral.**

Visualização esquemática de progressão tumoral normal, *in situ*, invasivo e metastática. Ductos normais de mama são compostos pela membrana basal e uma camada de células epiteliais luminiais e mioepiteliais. O estroma é composto por leucócitos, fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais. No carcinoma *in situ*, as células mioepiteliais são alteradas geneticamente e epigeneticamente e seu número diminui, provavelmente devido à degradação da membrana basal. Ao mesmo tempo, o número de células do estroma e células luminiais aumenta. A diminuição de células mioepiteliais e da membrana basal resulta no carcinoma invasivo, no qual células tumorais invadem o tecido adjacente, podendo migrar para órgãos distantes, levando à metástase. (adaptado de Polyak, 2007).

Devido à dificuldade de se diferenciar morfológicamente os diferentes tipos de tumor mamário, foi estabelecido, em 2001, uma nova classificação molecular baseada no perfil de expressão gênica desses tumores. Essa nova classificação, além de complementar a anatomia patológica, também tornou-se uma alternativa para avaliar a alta heterogeneidade tumoral característica do carcinoma mamário, que normalmente dificulta a rotina de prognósticos e a estratégia terapêutica a ser utilizada (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001).

De acordo com o perfil molecular estabelecido por Sorlie e colaboradores, foram definidos, então, cinco grandes subgrupos de tumores mamários, classificados como Luminal A, Luminal B, HER2-positivo, *basal-like* e normal *breast-like* (Sorlie *et al.*, 2001) (Tabela 1).

O subtipo luminal A está associado a um bom prognóstico sendo, geralmente, composto por tumores de baixo grau histológico e caracterizado pela alta expressão do receptor de estrogênio (RE) e/ou progesterona (RP) e ausência de expressão do fator de crescimento epidermal tipo 2 (HER2 ou ErbB2). Além disso, possui características de células epiteliais luminais, como, a elevada expressão das citoqueratinas 7, 8, 18, e 19.

O segundo subtipo, o luminal B, apresenta maior grau histológico, estando associado a um pior prognóstico em relação ao subtipo A e apresentando expressão tanto do RE quanto do HER2, além de outros genes que estão relacionados com a proliferação celular. Seu fenótipo não é tão semelhante a células epiteliais luminais e apresenta baixa expressão das citoqueratinas 7, 8, 18 e 19.

Os tumores do subtipo HER2-positivo possuem o segundo pior prognóstico em relação aos demais. São caracterizados pela superexpressão do HER2 e ausência de expressão dos receptores hormonais (RE e PR). Apesar da falta dos receptores, esse tipo de tumor apresenta boa resposta a drogas que bloqueiam a atividade do HER2, como, por exemplo, o anticorpo monoclonal trastuzumab (Ross *et al.*, 1999; Shak *et al.*, 1999).

O subtipo *basal-like*, também conhecido como triplo-negativo, é identificado pela ausência dos receptores de estrógeno, progesterona e HER2. Apresenta características de células basais/mioepiteliais de mama normal como, por exemplo,

a expressão do fator de crescimento epidérmico (EGFR), P-caderina, p63 e citoqueratinas 5,14 e 17 (Sorlie *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2004). Este perfil está associado com o pior prognóstico, sendo um dos mais intrigantes, pois não possui alvo terapêutico definido, e, portanto, não responde aos tratamentos hormonais e imunoterápicos disponíveis.

O subtipo *normal breast-like* apresenta um perfil de expressão comum às células epiteliais normais, às células adiposas e a outras células do estroma, sendo também considerado um triplo-negativo, entretanto, possui um crescimento lento e é pouco agressivo. Apesar de não estar muito clara sua distinção nem seu valor clínico é um subtipo avaliado como tendo um bom prognóstico.

**Tabela 1 : Classificação molecular dos subtipos tumorais de mama**

<b>Subtipo Molecular</b>	<b>Padrão de Imunomarcção</b>
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2-
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2+
HER2+	RE- , RP- , HER2+++
<i>Basal-like</i>	RE- , RP- , HER2- , EGFR+
<i>Normal breast-like</i>	RE- , RP- , HER2- , EGFR-

*Tabela com as características dos subtipos tumorais de mama. HER2 receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR: receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico; RE: receptor de estrógeno; RP receptor de progesterona.*

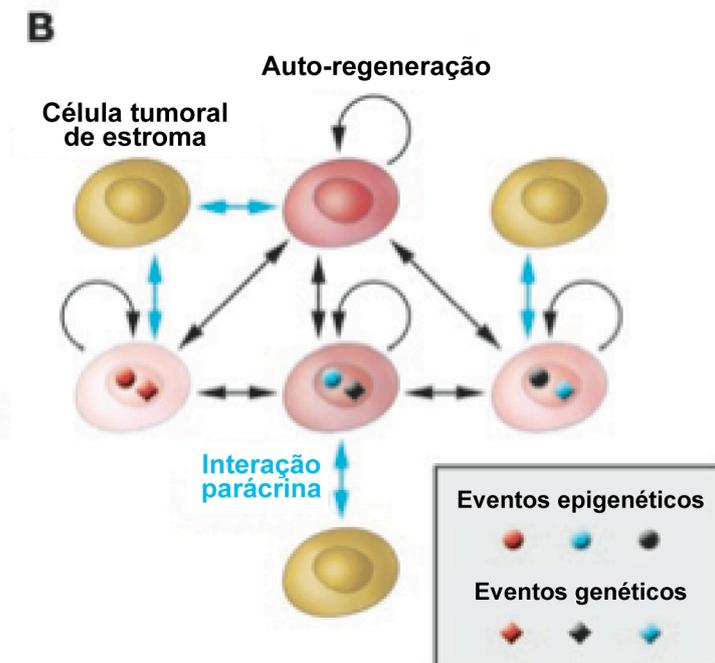
Apesar do avanço na metodologia de avaliação do prognóstico e sua utilização sempre crescente, a taxa de mortalidade devido ao carcinoma mamário ainda é muito alta. Uma das razões decorre do fato da atual classificação ser capaz de identificar apenas as pacientes que têm um excelente ou péssimo prognóstico. Para as remanescentes, os indicadores atuais não são suficientemente sensíveis para determinar decisões terapêuticas (Taneja *et al* 2010). Dessa forma, o óbito dessas pacientes se deve, principalmente, à doença metastática que se desenvolve

a partir do tumor primário. Para diminuir a alta taxa de mortalidade por câncer de mama, deve-se buscar novos marcadores que auxiliem o clínico a identificar pacientes com tumores potencialmente agressivos. Uma das pesquisas mais promissoras na área que vem estudando a progressão tumoral e descrevendo novos marcadores que possam ser utilizados no desenvolvimento de protocolos clínicos é a das células-tronco tumorais ou células iniciadoras tumorais.

## **1.2. Células iniciadoras tumorais**

Atualmente, existem duas hipóteses controversas na literatura que tentam explicar a formação do câncer. Uma explica a origem e a progressão do tumor através do modelo de células iniciadoras tumorais, como citado anteriormente, e, a outra, através do modelo da evolução clonal. Embora ambos os modelos concordem que o tumor origina-se a partir de uma célula que adquiriu mutações e potencial proliferativo ilimitado, existem diferenças importantes entre os dois, principalmente em relação à heterogeneidade celular do tumor (Campbell & Polyak 2007).

De acordo com o modelo da evolução clonal, o tumor surge a partir de células diferenciadas que adquiriram, ao longo do tempo, mutações progressivas que as tornam cada vez mais resistentes e com maior potencial proliferativo, levando à progressão do tumor. A heterogeneidade e a alta capacidade proliferativa observada nos tumores surgiriam a partir de pressão seletiva e acúmulo de mutações em diferentes subpopulações do tumor primário (Nowell 1976) (Figura 2).



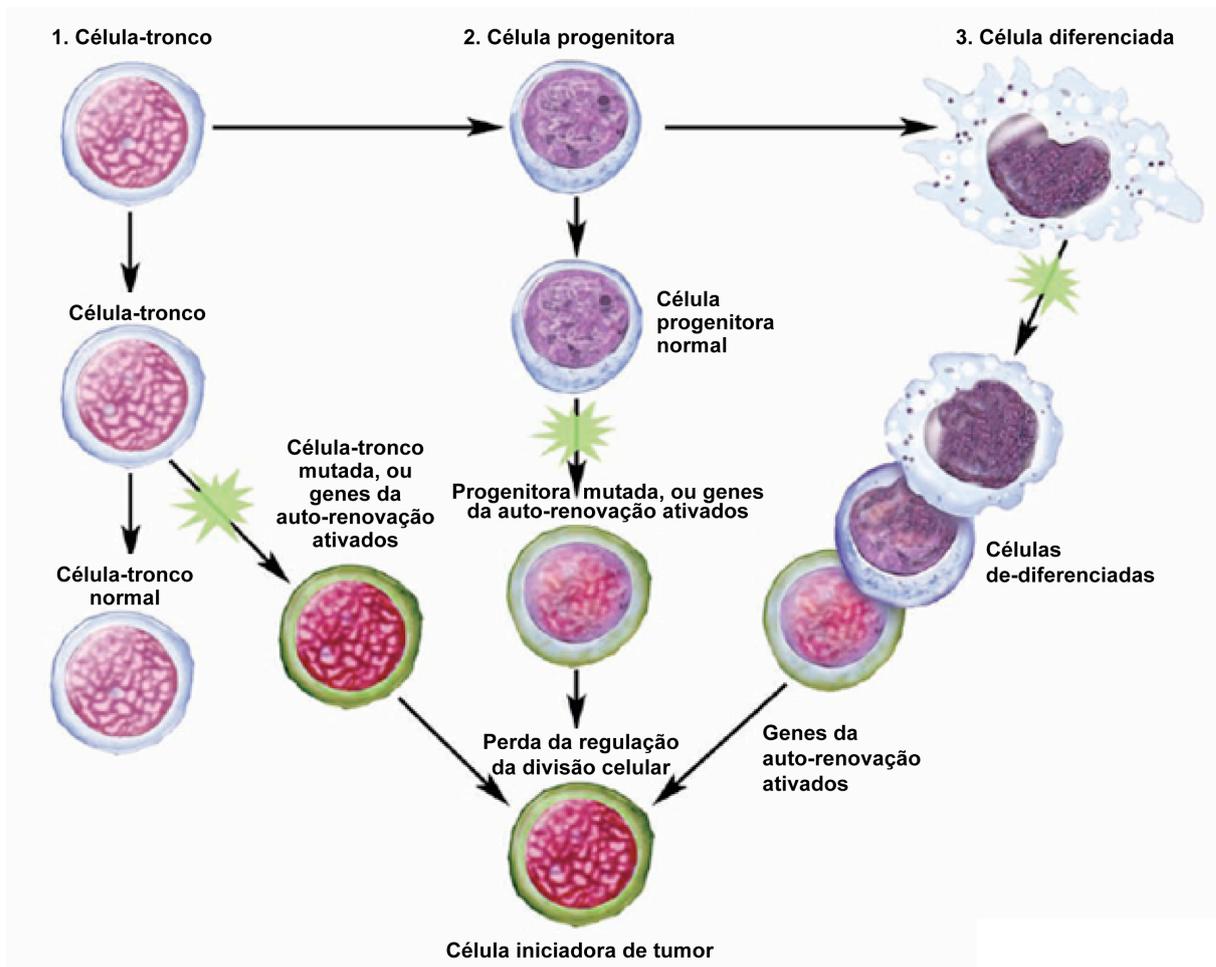
**Figura 2: Modelo hipotético explicando o modelo da evolução clonal.**

Baseado no modelo da evolução clonal, diferentes células diferenciadas adquirem diversas mutações genéticas e epigenéticas. Todas as células do tumor tem a capacidade de se dividir e todas as células contribuem para a progressão tumoral e a resistência à drogas. (adaptado de Polyak, 2007)

Apesar da evolução clonal ser a hipótese mais tradicional, estudos recentes questionam a superficialidade deste modelo e sugerem que a hipótese das células iniciadoras tumorais fornece maiores subsídios para explicar o desenvolvimento do câncer (Li *et al.*, 2003; Serakinci *et al.*, 2004).

A teoria das células iniciadoras tumorais compartilha interesses comuns da área de biologia de células-tronco e da biologia do câncer, principalmente em relação à proliferação celular (Lobo *et al.*, 2007). Células tronco são definidas como células indiferenciadas que apresentam capacidade duradoura de se auto-renovar e habilidade de originar diferentes tipos celulares. Na biologia de células-tronco, o maior interesse é num tipo de proliferação celular denominada auto-renovação (He *et al.*, 2009). Uma observação importante nestes estudos tem sido a notável

associação entre a desregulação dos mecanismos que controlam a auto-renovação de células-tronco normais, presentes nos tecidos, e a carcinogênese. Estas observações levaram à hipótese de que alguns tipos de câncer podem ter sido originados a partir de células que apresentam atividade intrínseca de auto-renovação, as células-tronco, ou de células diferenciadas que tiveram a capacidade de auto-renovação ativada por mutações (Figura 3). No primeiro caso, acredita-se que as células tronco presentes em tecidos com alta taxa de renovação celular, são as únicas com uma meia-vida suficientemente longa para sofrer diversas mutações, as quais podem levar à transformação maligna (Vermeulen *et al.*, 2008). Por outro lado, cada vez mais se tem evidências de que células diferenciadas podem ser alvos de uma reprogramação gênica que altera seu fenótipo para aquele de células-tronco. Um exemplo dessa reprogramação gênica são as células tronco pluripotentes induzidas (iPS), que foram classicamente demonstradas por Yamanaka. Neste trabalho, foi verificado que quatro genes específicos (Oct4, Sox2, KLF-4 e c-Myc) eram capazes de converter células somáticas diferenciadas em células tronco pluripotentes funcionais (Takahashi & Yamanaka *et al.*, 2006). Interessantemente, a maioria desses fatores de reprogramação são superexpressos em pelo menos algum tipo de tumor humano e dois deles, c-Myc e Klf4, são estabelecidos como oncogenes (Krizhanovsky & Lowe., 2009).



**Figura 3: Modelo hipotético explicando a origem de células iniciadoras de tumor.**

Baseado na hipótese de células iniciadoras de tumor, as alterações genéticas podem acometer tanto as células-tronco como as células progenitoras presentes nos tecidos normais. Também é considerado que as células diferenciadas sofrem diversas mutações, levando à reprogramação destas células para um estado indiferenciado. Os três casos resultarão na formação de células iniciadoras tumorais, que possuem a capacidade de auto-renovação e de se diferenciar em outros tipos celulares, dando origem aos diversos tipos celulares presentes no tumor. (adaptado do National Institutes of Health, NIH, disponível em [http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative\\_Medicine/pages/2006chapter9.aspx](http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/pages/2006chapter9.aspx))

Independente de sua origem, as células iniciadoras de tumor apresentam propriedades de auto-renovação tanto ao nível funcional como molecular. A organização celular hierárquica e a heterogeneidade celular típica, encontradas no

tumor, são devidas à capacidade destas células de se dividirem tanto simetricamente, originando duas células idênticas, quanto assimetricamente, originando uma célula idêntica à célula de origem e uma célula mais diferenciada. Além disso, de acordo com este modelo, e contrastando com o modelo da evolução clonal, dentro da massa tumoral, apenas uma pequena parcela das células presentes, as iniciadoras de tumor, são tumorigênicas, e podem levar à progressão tumoral e à resistência a múltiplas drogas (Campbell & Polyak 2007).

O conceito de células iniciadoras de tumor foi inicialmente proposto no século XIX por Rudolph Virchow através de análises microscópicas, comparando hiperplasias com células em diferenciação (revisto por Lobo NA *et al.*, 2007). Entretanto, este modelo não alcançou grande repercussão devido à inexistência, naquela época, de técnicas capazes de testar sua veracidade. Atualmente, com o surgimento de tecnologias acuradas, e a possibilidade de realizar a identificação, isolamento e caracterização de subpopulações de células, a teoria de Virchow foi retomada, possibilitando que diversos estudos gerassem evidências que corroboram esta teoria (revisto por Croker & Allan 2008).

Os primeiros relatos da identificação e do isolamento das células iniciadoras de tumor datam da década de 90, quando dois grupos (Lapidot *et al.*, 1994; Bonnet *et al.*, 1997) isolaram uma pequena população de células de leucemia mielóide aguda (LMA) que, assim como células-tronco hematopoiéticas (Terstappen *et al.*, 1991), apresentavam expressão da proteína CD34 e ausência da CD38. Os dois trabalhos utilizaram camundongos imunodeficientes (NOD/SCID) para avaliar a proliferação e o potencial de auto-renovação das células isoladas de LMA humana. Os autores observaram que apenas a subpopulação de células CD34+/CD38-, foi capaz de reproduzir o quadro de leucemia quando injetadas em camundongos

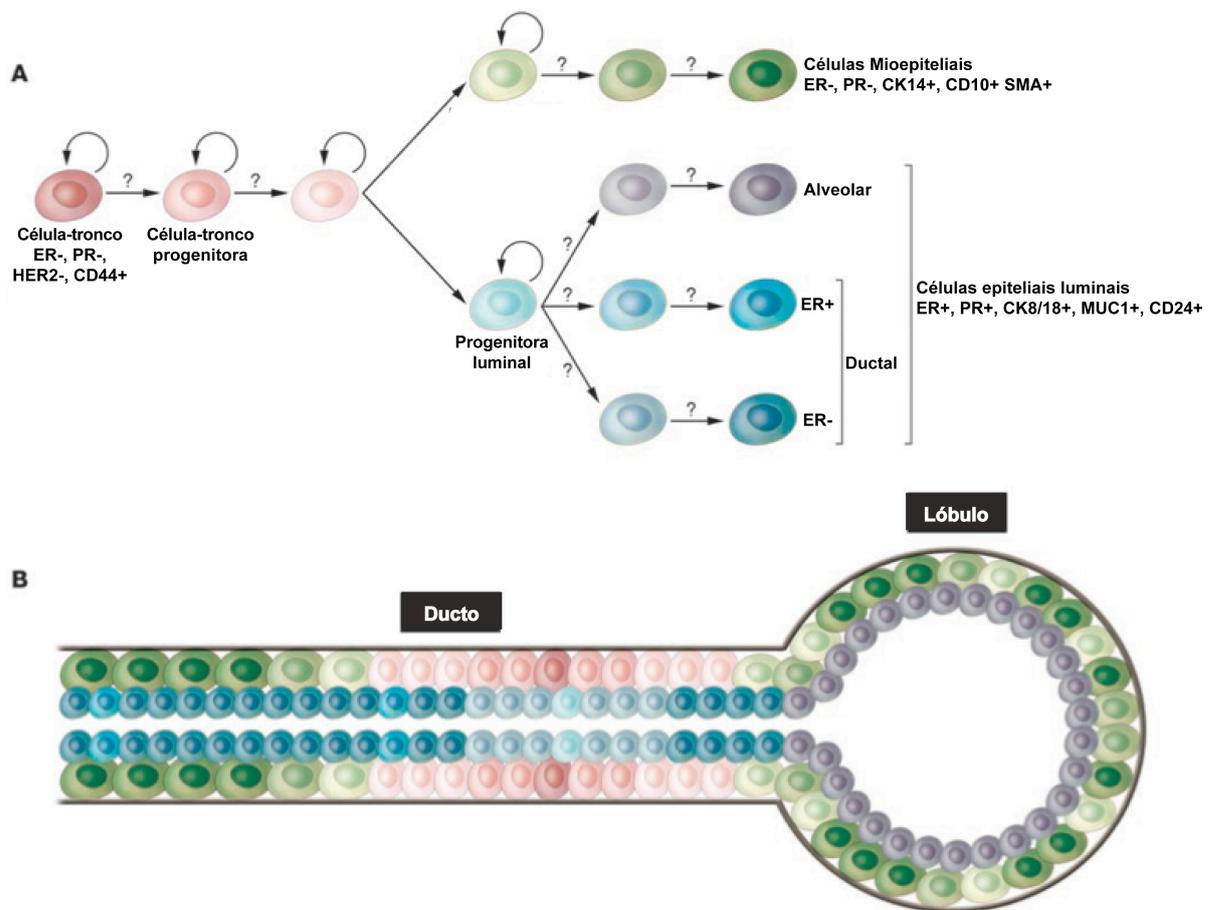
NOD/SCID. Foi observado, também, que as células tumorais derivadas das células transplantadas encontravam-se em vários estágios de diferenciação, sendo que muitas se diferenciavam em células sanguíneas, reproduzindo, assim, a heterogeneidade do tumor primário. A LMA tem sido, desde então, o modelo mais utilizado para abordar o estudo de células iniciadoras tumorais, devido à facilidade de obtenção deste material e da grande quantidade de resultados acumulados na literatura sobre células-tronco hematopoiéticas. Estudos posteriores elucidaram o imunofenótipo das células iniciadoras leucêmicas e demonstraram que estas células possuem expressão de outros marcadores que as associam não só com células tronco hematopoiéticas, mas, também, com a resistência a multidrogas (Blair *et al.*, 1998; Blair *et al.*, 2000; Hope *et al.*, 2004). Além disso, mais recentemente, Majeti e cols identificaram, em tecido hematopoiético normal, células progenitoras com o mesmo fenótipo de células-tronco leucêmicas (Majeti *et al.*, 2007), o que sugere que estas células possivelmente originaram-se de células progenitoras multipotentes. Tal fato foi de extrema relevância para consolidar a hipótese de células iniciadoras de tumor.

Com bases nos resultados encontrados em LMA, outros grupos buscaram aplicar o modelo das células iniciadoras tumorais para descrever tumores sólidos. O carcinoma de mama foi o primeiro modelo do qual foi isolado uma subpopulação de células capazes de refazer o tumor primário tanto *in vitro* como *in vivo* (All-Hajj *et al.*, 2003). A partir desse trabalho, foram identificadas e isoladas células iniciadoras de tumor em diversos outros tipos de tumores, como, osteoblastoma (Gibbs *et al.*, 2005), glioblastoma (Singh *et al.*, 2004a; Singh *et al.*, 2004b), câncer de próstata (Collins *et al.*, 2005), melanoma (Fang *et al.*, 2005), mieloma múltiplo (Matsui *et al.*, 2004), câncer de cólon (O'Brien *et al.*, 2007; Ricc-Vitiani *et al.*, 2007), câncer de

pâncreas (Li *et al.*, 2007) e câncer de cabeça e pescoço (Prince *et al.*, 2007), entre outros.

### **1.3. Células iniciadoras tumorais no câncer de mama**

A glândula mamária é um órgão estruturalmente dinâmico que passa por um extenso remodelamento e diferenciação. Diferentemente dos outros órgãos, os principais eventos de diferenciação da glândula mamária ocorrem após o nascimento (Lanigan *et al.*, 2007). Os vários estágios de desenvolvimento pós-natal da mama, sucedidos durante a puberdade, gestação lactação e involução, associam-se, diretamente, ao desenvolvimento sexual e reprodutivo da mulher (Lanigan *et al.*, 2007; Sternlicht, 2006). Em adultos, a glândula consiste de uma estrutura formada por ductos ramificados e unidades lóbulo-alveolares. O epitélio mamário é organizado em duas camadas formadas por células epiteliais luminais na parte interna e células mioepiteliais na parte externa. Diversas características da estrutura e do desenvolvimento da glândula mamária adulta mostram que, possivelmente, este órgão possui uma organização celular hierárquica composta por células-tronco (Figura 4). A existência das células-tronco mamárias é indicada tanto pela (i) capacidade da glândula expandir e regenerar durante a puberdade e de sucessivos ciclos reprodutivos (Woodward *et al.*, 2005); como pela (ii) presença de duas linhagens diferentes que tem origem a partir da mesma célula progenitora (Woodward *et al.*, 2005); como também pela (iii) alta taxa de renovação celular do epitélio do lúmen (Shackleton *et al.*, 2006). Baseados nessas evidências, estudos identificaram, em tecido mamário humano e de camundongo, a existência de células indiferenciadas, com propriedades de células-tronco, capazes de reconstituir e desenvolver completamente uma glândula mamária *in vivo* (Bocker *et al.*, 2002; Shackleton *et al.*, 2006).



**Figure 4: Modelo Hipotético da hierarquia das células tronco epiteliais mamárias e diferenciação.**

(A) Representação das células-tronco mamárias e das células resultantes das divisões simétricas e assimétricas. Células-tronco dão origem a células epiteliais luminiais e mioepiteliais, mas os passos intermediários e a regulação não são ainda conhecidos. O modelo é simplificado, uma vez que existem muitos tipos diferentes de células epiteliais e mioepiteliais. (B) Figura esquemática da parte terminal de uma unidade ducto-lobular com a possível localização de várias células-tronco e diferenciadas. A linha cinza representa a membrana basal; As cores das células das figuras A e B estão relacionadas. (adaptado de Polyak,2007). De acordo com a teoria de células iniciadoras de tumor, estas células indiferenciadas presentes na mama, responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção do órgão, poderiam sofrer uma transformação maligna e, conseqüentemente, dar origem ao carcinoma mamário.

Em 2003, Al-Hajj e colaboradores apresentaram evidências da existência de uma pequena subpopulação de células, definida como CD44+/CD24-, presentes em efusões pleurais derivadas de carcinomas mamários malignos, que era capaz de

formar o tumor primário *in vivo* (All-Hajj *et al.*, 2003). Foi observado que apenas 100 células com este fenótipo eram suficientes para refazer o tumor primário em camundongos imunocomprometidos NOD/SCID, enquanto mais de 1.000 células da população restante (CD44-/CD14+) não eram capazes de induzir a formação de tumor nos animais. Também foi observado que o tumor formado a partir desta subpopulação apresentava diversos outros tipos celulares, que reproduziam a heterogeneidade do tumor inicial, demonstrando, assim, a capacidade de auto-renovação dessas células.

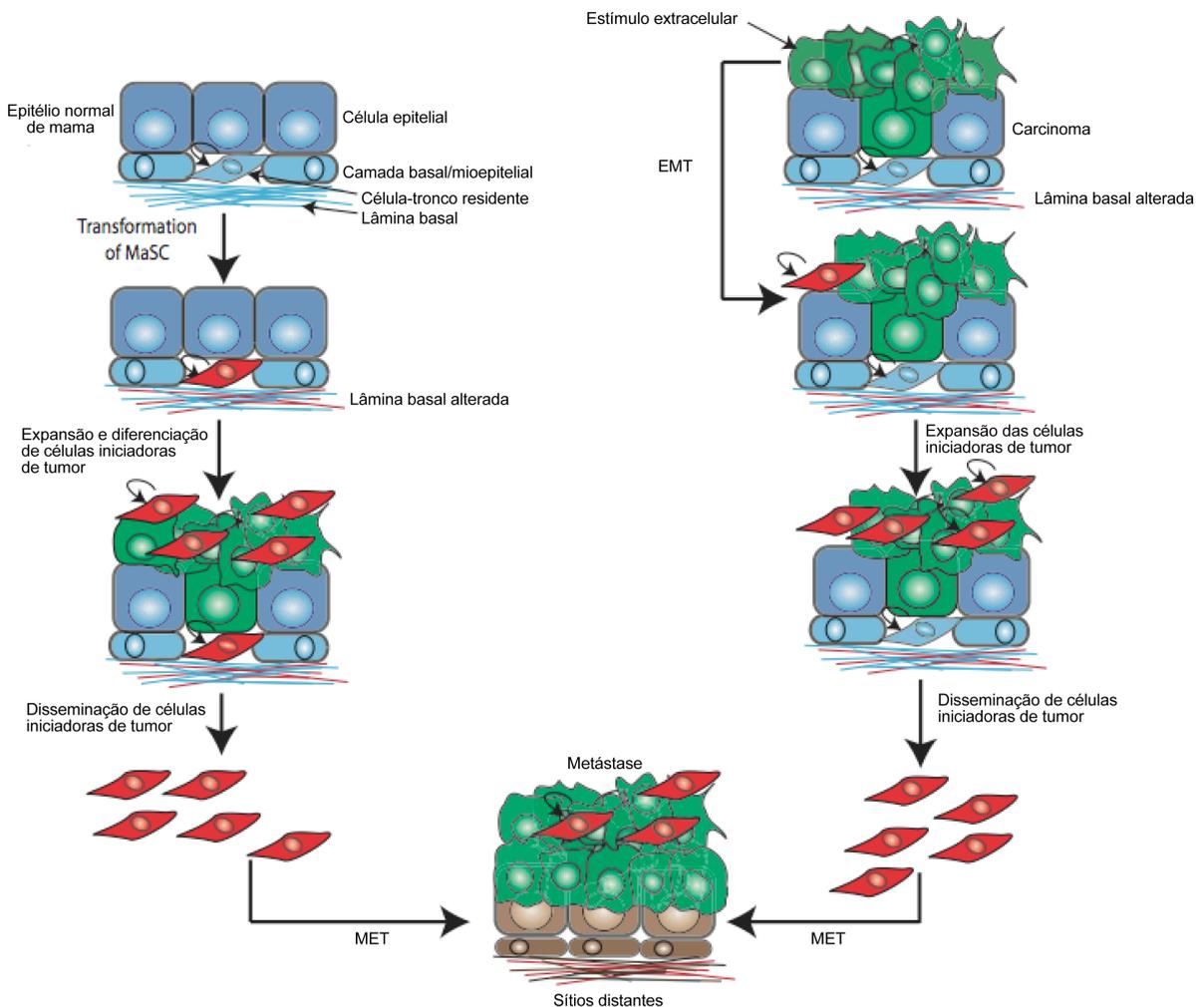
Um outro fato que caracteriza a população celular CD44+/CD24- como possíveis células iniciadoras de tumor é a capacidade dessas células de formarem esferas quando cultivadas em suspensão. O crescimento clonal em cultura não-aderente foi originalmente utilizado para testar a capacidade de auto-renovação de células neurais (Reynolds & Weiss, 1996). Esta técnica foi adaptada para células de mama humanas por Dontu e colaboradores. De acordo com este trabalho, as mamosferas formadas a partir de células epiteliais normais de mama são altamente enriquecidas em células indiferenciadas e possuem a capacidade de gerar outras linhagens quando cultivadas sob condições adequadas (Dontu *et al.*, 2003). Usando esta técnica de crescimento independente de ancoragem *in vitro* Ponti e colaboradores foram capazes de crescer mamosferas a partir de uma suspensão de células-únicas obtidas a partir da dissociação de tumores primários de mama. A vasta maioria das células presentes nesta cultura eram CD44+/CD24- e foram capazes de iniciar tumores em camundongos imunodeficientes. Além disso, foi observado que estas células eram capazes de se auto-renovar e diferenciar em diversos tipos celulares maduros relacionados com o tecido mamário (Ponti *et al.*, 2005).

Outros trabalhos que se seguiram analisaram o fenótipo CD44+/CD24- em diversas linhagens celulares de carcinoma mamário. Estes trabalhos identificaram células CD44+/CD24- nestas linhagens e demonstraram que, assim como descrito anteriormente, as células com esse fenótipo eram capazes de iniciar o tumor em camundongos, diferenciar em outros tipos celulares e formar mamosferas em culturas não-aderentes (Filmore *et al.*, 2008; Horwitz 2008).

Com a identificação dos possíveis marcadores, CD44 e CD24, e a possibilidade de isolar as células iniciadoras de tumor de mama, muitos trabalhos vem buscando, cada vez mais, caracterizar esta subpopulação celular para melhor entendimento do carcinoma mamário. Uma propriedade que foi avaliada e que é importante mencionar, é a propensão dessas células à metástase e, conseqüentemente, sua relação com o processo de transição epitélio-mesenquimal.

A transição epitélio-mesenquimal é um processo biológico fundamental no desenvolvimento embrionário, que permite que uma célula epitelial polarizada, interagindo com a membrana basal, sofra modificações que resultam na aquisição de um fenótipo de célula mesenquimal com capacidade migratória (Hay, 1995; Perez-Pomares and Munoz-Chapuli, 2002; Thiery and Sleeman, 2006). Na carcinogênese, a transição epitélio-mesenquimal é descrita como um dos eventos que ocorrem durante a progressão para o estágio metastático, capacitando as células tumorais a entrar na circulação e sair em sítios remotos de outros tecidos, onde formarão macro- e micrometastases (Kalluri and Weinberg, 2009). A possível relação entre o modelo de células iniciadoras de tumor e aquele de transição epitélio-mesenquimal surgiu a partir da análise do processo de reparo de tecido, que capacita as células-tronco adultas, como as células da medula óssea, a entrar e sobreviver na circulação indo até o sítio secundário, onde elas proliferam,

diferenciam e participam da reconstrução do tecido (Kondo *et al.*, 2003). Mani e colaboradores apresentaram dados que suportam a conexão entre os dois modelos. Neste trabalho, foi demonstrado que as células epiteliais mamárias, quando induzidas à transição epitélio-mesenquimal *in vitro*, formaram células com características das células iniciadoras tumorais de mama, ou seja, com o fenótipo CD44+/CD24-, capacidade de formar mamosferas e de iniciar tumor mais eficientemente. Foi demonstrado, também, que as células iniciadoras de tumor de mama, isoladas de camundongo e de tecido humano, expressavam marcadores associados a células que sofreram a transição epitélio-mesenquimal (Mani *et al.*, 2008) (Figura 5). Corroborando esses dados, dois trabalhos foram publicados, ratificando que existe uma possível relação entre as células iniciadoras de tumor mamário e o processo de transição epitélio-mesenquimal (Morel *et al.*, 2008; Radisky *et al.*, 2008). Os resultados desses três trabalhos proporcionaram uma explicação plausível para questões que permanecem em aberto nos dois modelos. O processo de transição epitélio-mesenquimal seria uma explicação para a formação de células iniciadoras de tumor a partir de células diferenciadas, uma vez que esta transição, normalmente, é mediada por estímulos extracelulares e fatores presentes no microambiente (Thiery *et al.*, 2009). Já o modelo de células tumorais circulantes explicaria como as células são capazes de reverter a transição, proliferar e originar outros tipos celulares no sítio secundário. Esta convergência entre estes dois modelos acrescentou subsídios para o melhor entendimento do processo de malignização no carcinoma mamário.



**Figure 5: Transição epitélio-mesênquimal e células iniciadoras de tumor na progressão do câncer de mama.**

Na figura esquemática da esquerda, células iniciadoras de tumor, originadas a partir de células-tronco que sofreram transformação, exibem as características de transição epitélio-mesênquimal. Na figura da direita, uma célula tumoral esporádica sofre a transição epitélio-mesênquimal, adquirindo capacidade migratória e características de células iniciadoras de tumor. As células com capacidade migratória, invadem a circulação e alcançam um outro microambiente distante. As células iniciadoras de tumor podem reverter o fenótipo para células epiteliais (transição mesênquima-epitelial) o que permite a adesão e proliferação no novo sítio. (adaptado de May *et al.*, 2011).

Com intuito de avaliar o valor clínico dos marcadores identificados por All-Hajj nos subtipos tumorais mamários já descritos, iniciaram-se, então, as investigações do fenótipo CD44+/CD24- em pacientes portadoras de câncer de mama. Abraham e

colaboradores sugeriram que as células CD44+/CD24- em câncer de mama aparentemente não estão associadas ao grau de malignidade ou com a sobrevida de pacientes, entretanto, estas células poderiam favorecer a ocorrência de metástase à distância (Abraham et al., 2005). A mesma indefinição foi apresentada nas investigações realizadas por Honeth e colaboradores. Neste trabalho, os autores observaram uma associação entre o fenótipo CD44+/CD24- com o subtipo *basal-like* e o gene clássico de câncer de mama BRCA1. Entretanto, foi enfatizado que nem todos os subtipos *basal-like* apresentavam células CD44+/CD24-, e apenas alguns tumores HER2+ expressaram este fenótipo (Honeth et al., 2008). Já o trabalho realizado por Mylona, demonstrou que o fenótipo CD44+/CD24- não exerce um impacto significativo no prognóstico das pacientes e, na verdade, são os tumores CD44-/CD24+ que identificaram pacientes com a pior sobrevida global e livre de doença (Mylona et al., 2008). Buscando elucidar essas divergências, Ahmed e colaboradores fizeram uma análise de imunohistoquímica de 1.036 amostras de tumores de mama invasivo. Através desta análise em larga escala, foi demonstrado que os marcadores CD44 e CD24, separadamente, parecem ter relevância no prognóstico do carcinoma mamário invasivo. Entretanto, quando analisados em conjunto, não apresentaram relevância clínica significativa. Assim como demonstrado por Mylona, as pacientes com tumores expressando o fenótipo CD44-/CD24+ apresentavam o pior prognóstico quando comparadas com as pacientes com tumores ricos em células CD44+/CD24- (Ahmed et al., 2011). Este trabalho levantou questões interessantes sobre a utilidade clínica das células CD44+/CD24-, enfatizando se a identificação desta população em tumores mamários poderia realmente beneficiar o prognóstico das pacientes. Além disso, torna-se claro que o fenótipo CD44+/CD24- não é um padrão universal de células iniciadoras de tumor de

mama e, conseqüentemente, outros marcadores que estejam relacionados com tumores mamários potencialmente agressivos precisam ser identificados para, assim, complementar, de forma mais precisa, o protocolo clínico de prognóstico e a estratégia terapêutica a ser utilizada nas pacientes.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Estudar os marcadores de células-tronco, definidos pela *The International Society for Cellular Therapy*, no modelo de câncer de mama, buscando novos alvos que estejam relacionados com tumores mamários potencialmente agressivos e, conseqüentemente, contribuir para o estabelecimento de novos protocolos clínicos de diagnóstico, prognóstico e terapêutica do câncer de mama.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Analisar a expressão de 10 marcadores de células-tronco em quatro linhagens de carcinoma mamário (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435, Hs578-T), que apresentam diferentes graus de malignidade, em comparação com uma linhagem de mama não-tumorigênica (MCF10-A);
- Selecionar os marcadores gênicos que se apresentam diferencialmente expressos nas linhagens de mama;
- Analisar a função de um dos marcadores selecionados através de silenciamento gênico (*gene knockdown*) na linhagem mais maligna de mama (Hs578-T) e superexpressão na linhagem não-tumorigênica MCF10-A;
- Caracterizar as linhagens celulares geradas quanto ao crescimento celular, potencial invasivo e metastático;
- Analisar a via de sinalização de EGF, o marcador NK1 e marcadores de transição epitélio-mesenquimal.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Plasmídeos

pMDL - Vetor codificante das sequências gag e pol.

pREV - Vetor codificante das sequências do envelope viral, que regulam a expressão lentiviral ao nível pós-transcricional.

pVSVG - Vetor codificante das sequências do envelope viral heterólogo, derivado de *G glycoproteins of vesicular stomatitis virus*.

pLV-eGFP - Vetor lentiviral pLV-EGFP que expressa o gene eGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*) construído e cedido pelo Dr. Marcos A. Demasi.

shRNA CD90 - Vetores do sistema *Mission shRNA* (Sigma Aldrich) detentores de sequências shRNA distintas para inibição do CD90, além de um cassete que confere resistência à puomicina: TRCN 0000057023, TRCN 0000057024, TRCN 0000057025, TRCN 0000057026, TRCN 0000057027.

shRNA *non-target* - vetor controle do sistema *Mission shRNA*.

pGL4.44[*luc2P/AP1 RE/Hygro*] - Vetor contendo seis cópias do elemento responsivo AP-1 (AP1 RE) que induz a transcrição da gene repórter luciferase *luc2P* (Promega).

#### 3.2. Linhagens celulares

MCF10-A: linhagem celular epitelial não tumoral derivada de doença fibrocística mama humana (ATCC: CRL10317). A linhagem parental foi isolada de tecido primário da mama de uma mulher de 36 anos (Soule *et al.*, 1990). Foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Nathalie Cella.

MCF-7: linhagem celular epitelial derivada de carcinoma ductal invasivo mamário humano (ATCC: HTB-22). A linhagem parental foi isolada de efusão pleural de uma mulher de 69 anos (Soule *et al.*, 1973). Foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro.

MDA-MB-231: linhagem celular epitelial derivada de um adenocarcinoma mamário humano (ATCC: HTB-26). A linhagem parental foi isolada de efusão pleural de uma mulher de 51 anos (Cailleau *et al.*, 1978), sendo Receptor de estrógeno e progesterona negativa. Foi gentilmente cedida pela Profa. Maria Aparecida Nagai (Faculdade de Medicina, USP).

MDA-MB-435: linhagem celular epitelial derivada de carcinoma ductal invasivo mamário humano (ATCC: HTB-129). A linhagem parental foi isolada de efusão pleural de uma mulher de 31 anos (Cailleau *et al.*, 1978), tendo sido gentilmente cedida pela Profa. Anamaria Camargo (Instituto Ludwig, Brasil).

Hs578-T: linhagem celular epitelial derivada de um carcinosarcoma mamário humano (ATCC: HTB-126). A linhagem parental foi isolada de tecido primário da mama de uma mulher de 74 anos (Hackett *et al.*, 1977). Foi adquirida da ATCC.

293T: linhagem de rim embrionário humano, derivada de células HER293 transformadas com o antígeno *large T* de SF-40, apresenta alta eficiência de transfecção (DuBridge *et al.*, 1987).

**Tabela 2 : Características das Linhagens celulares de mama humanas**

<b>Linhagem celular</b>	<b>RE</b>	<b>RP</b>	<b>Origem</b>	<b>Tipo Histológico</b>	<b>Potencial Invasivo<sup>a</sup></b>	<b>Potencial Metastático<sup>b</sup></b>
MCF10-A	-	-	TP	FC	-	-
MCF-7	+	+	EP	CDI	+	-
MDA-MB-231	-	-	EP	CDI	++++	+
MDA-MB-435	-	-	EP	CDI	+++	++++
Hs578-T	-	-	TP	CS	++++	++++

*Tabela baseada no trabalho publicado por Marc Lacroix e Buy Leclercq (Lacroix et al., 2006).*

**RE:** status do receptor de estrógeno; **RP:** status do receptor de progesterona; **FC:** Fibrose Cística; **CDI:** carcinoma ductal invasivo; **AC:** adenocarcinoma; **CS:** carcinosarcoma.

<sup>a</sup>Potencial invasivo analisado em ensaios de quimioinvasão através de membrana basal reconstituível, MATRIGEL™ em placas do tipo Transwell®. <sup>b</sup>Potencial metastático verificado através de ensaios de metástase espontânea em camundongo imunodeficiente do tipo nude.

### **3.3. Soluções e meios de cultura para células de mamíferos**

Meios de cultura:

DMEM: (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

RPMI: (desenvolvido no *Roswell Park Memorial Institute*) (Life Technologies).

HAM'S F12: (*Nutrient mixture F-12*) (Life Technologies).

Soluções:

Solução salina: PBSA ("Phosphate Buffered Saline" – sem cálcio ou magnésio), solução salina tamponada pH 7.2, composta por NaCl 140mM, KCL 2.7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5mM.

Tripsina: solução 0.1% de tripsina (Gibco) em PBSA contendo EDTA 1mM 9pH 8.0).

Solução Versene: EDTA 10mM (pH 8.0) em PBSA.

Suplementos:

Soro fetal bovino: SFB (Atená Biotecnologia, Campinas, SP, Brasil).

Soro fetal cavalo: SFC (Atená Biotecnologia).

Ampicilina: Concentração utilizada: 25mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Estreptomicina: Concentração utilizada: 10mg/mL (Sigma-Aldrich).

Hidrocortisona: Concentração utilizada: 5mg/mL (Fisher Scientific, USA).

Insulina: Concentração utilizada: 10mg/mL (Sigma-Aldrich).

Enterotoxina colérica: Concentração utilizada: 10 $\mu$ M (Sigma-Aldrich).

EGF: Concentração utilizada: 20ng/mL (R&D, USA).

### **3.4. Soluções e meios de cultura para bactérias**

Meio de Cultura

LB (Luria-Bertani): composto por triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L e NaCl 10g/L, pH 7,5. Para preparo de meio sólido adicionou-se 15g/L de ágar (Gibco-BRL).

SuperBroth: para cultivo bacteriano, composto por tristonha 32g/L, extrato de levedura 20g/L, NaCl 5g/L, pH 7.5.

Suplementos:

Ampicilina: Concentração utilizada 150 $\mu$ g/mL (Sigma, USA)

### 3.5. Anticorpos

Os anticorpos utilizados para ensaios de citometria de fluxo e western blot estão descritos nas tabelas abaixo:

**Tabela 3: Anticorpos utilizados para o ensaio de citometria de fluxo**

<b>Anticorpo</b>	<b>Cat. Nº</b>	<b>Empresa</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>Diluição</b>
IgG1-k isotype control	BD555748	BD Bioscience	FITC	1:200
IgG2a-k isotype control	BD555574	BD Bioscience	PE	1:200
CD90/Thy-1	AB11155	Abcam	FITC	1:200
CD14	AB25390	Abcam	PE/Cy5.5	1:400
CD44	BD559942	BD Bioscience	APC	1:200

*Tabela com as características dos anticorpos conjugados a fluoróforos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo. A diluição foi previamente padronizada em experimentos com diferentes concentrações dos anticorpos. **Cat. Nº**: número do catálogo*

**Tabela 4: Anticorpos primários utilizados para o ensaio de western-blot**

<b>Anticorpo</b>	<b>Cat. Nº</b>	<b>Empresa</b>	<b>PM (KDa)</b>	<b>Fonte</b>	<b>Diluição</b>
CD90/Thy-1	#9798	Cell Signaling	20	Rabbit	1:1000
Vimentina	V6630	Sigma-Aldrich	58	Mouse	1:1000
E-caderina	AB53033	Abcam	29-38	Rabbit	1:1000
N-caderina	AB12221	Abcam	75-105	Rabbit	1:1000
Fibronectina	F3648	Sigma-Aldrich	94	Rabbit	1:1000
Erk1/2	#4695	Cell Signaling	44-42	Rabbit	1:1000
pErk1/2	#4370	Cell Signaling	44-42	Rabbit	1:1000
Jnk	#9258	Cell Signaling	46-54	Rabbit	1:1000
pJnk	#9255	Cell Signaling	46-54	Mouse	1:1000
c-Jun	SC1694	Santa Cruz	48	Rabbit	1:1000
p-c-Jun	#3270	Cell Signaling	48	Rabbit	1:1000
c-Fos	#2250	Cell Signaling	62	Rabbit	1:1000
p-c-Fos	#5348	Cell Signaling	62	Rabbit	1:1000
EGF-R	#3777	Cell Signaling	175	Rabbit	1:1000
pEGF-R	#4267	Cell Signaling	175	Rabbit	1:1000
Actina	A5441	Sigma-Aldrich	42	Mouse	1:1000

*Tabela com as características dos anticorpos primários utilizados nos ensaios de Western Blot. A diluição foi previamente padronizada em experimentos com diferentes concentrações dos anticorpos. **Cat. Nº:** número do catálogo.*

**Tabela 5: Anticorpos secundários utilizados para o ensaio de western-blot**

<b>Anticorpo</b>	<b>Cat. Nº</b>	<b>Empresa</b>	<b>Diluição</b>
Anti-rabbit IgG	#70745S	Cell Signaling	1:2000
Anti-mouse IgG	#7076S	Cell Signaling	1:2000

*Tabela com as características dos anticorpos secundários conjugados a peroxidase utilizados nos ensaios de Western Blot. A diluição foi previamente padronizada em experimentos com diferentes concentrações do anticorpo. **Cat. Nº:** número do catálogo.*

### **3.6. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares humanas**

A linhagem não-tumorigênica de mama MCF10-A foi cultivada conforme descrito por Soule e colaboradores (Soule *et al.*, 1990). As linhagens de carcinoma

mamário humano foram mantidas em meio de cultura específico suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 25mg/L de ampicilina e 100mg/L de estreptomicina. Todas as linhagens foram cultivadas a temperatura de 37°C em frascos plásticos descartáveis em atmosfera de 2% CO<sub>2</sub> / 98% ar, para a manutenção do pH próximo ao fisiológico. Ao atingirem, aproximadamente, 80% da densidade de saturação as culturas celulares foram lavadas com PBSA e subcultivadas utilizando solução de tripsina para despreparar as células do substrato. Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo contendo 10% DMSO (dimetilsulfóxido estéril) a -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

Todas as linhagens utilizadas neste estudo foram testadas quanto a presença de *Mycoplasma spp.*, por reação de PCR com primers específicos.

### **3.7. Ensaio de RT-PCR Quantitativo**

#### **3.7.1. Extração do RNA total das linhagens celulares**

A extração do RNA total das linhagens celulares foi realizada a partir de aproximadamente 1x10<sup>6</sup> células de cada linhagem, utilizando-se os reagentes do RNeasy Kit (GE Healthcare, Chalfont, Reino Unido), conforme as especificações do fabricante.

Os tecidos coletados e armazenados em nitrogênio líquido, foram macerados, com auxílio de cadinho e pistilo, e o RNA total foi extraído através do método do Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme especificação do fabricante.

A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro (*Nanodrop Spectrophotometer ND-100*, Thermo Scientific, Wilmington, USA). O grau de pureza

da preparação foi estimado pela relação Abs260nm/Abs280nm, considerando-se, como pureza satisfatória, uma relação próxima de 2.0.

### **3.7.2. Síntese da primeira fita do cDNA**

Partindo-se de 1µg de RNA total das amostras, foram sintetizadas as fitas simples de cDNA através de transcrição reversa, utilizando-se a enzima Super Script III (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Os cDNAs sintetizados foram então utilizados como *template* para a reação de PCR quantitativo.

### **3.7.3. Desenho dos *primers***

Os *primers* utilizados para amplificação dos genes nos experimentos de RT-PCR quantitativo foram desenhados com o auxílio do programa computacional *Primers Express versão 3.0* (Life Technologies), tendo sido sintetizados pela empresa Invitrogen.

Para que apresentassem um bom desempenho nas reações de PCR quantitativo, os oligos foram desenhados de acordo com as seguintes características: amplificação de fragmentos de aproximadamente 150pb, conteúdo de CG entre 30 e 80%, incapacidade de formação de dímeros ou de estruturas secundárias e apresentar temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C. Além disso, a fim de evitar uma eventual coamplificação de DNA genômico contaminante, a maior parte dos pares de *primers* foram desenhados em exons diferentes do gene.

Tabela 6: Sequencia dos oligonucleotideos utilizados nos de ensaios de qRT-PCR

<b>Gene</b>	<b>Sequencia Do Oligonucleotideo</b>
<b>ABCG2</b>	F: GTCAACTCCTCCTTCTACAAA R: GGCACCTATAACCAGTCC
<b>C-KIT</b>	F: CCCCGGGATGGATGTTTTG R: CCTGGGTTCTGGGCTCTTG
<b>CD14</b>	F: CCGCTGGTGCACGTCTCT R: AATCTTCATCGTCCAGCTCACA
<b>CD24</b>	F: AGTCCAATGTGGCAAGGAAAA R: TGTGTCAATAAAAGGTGTGGAATTAGT
<b>CD29</b>	F: CATCTGCGAGTGTGGTGTCT R: GTTGGACCGGCTGGGGTAAT
<b>CD31</b>	F: TGCCCTGCTCCCACAGA R: GATTTAAGAACCGGCAGCTTAGC
<b>CD44</b>	F: CAACCGTTGGAAACATAACC R: CAAGTGGGAACCTGGAACGAT
<b>CD90</b>	F: CATCTGCGAGTGTGGTGTCT R: CCCACCATCCCCTACTACC
<b>CD105</b>	F: GCACCGATCCAGACCAC R: GCACTGCGCAAGACAAAC
<b>CD200</b>	F: AGGTGGTCTTCAGAGAATTTGTAGTG R: CAGCCCATAGTATCCCT
<b>GAPDH</b>	F: ACCCACTCCTCCACCTTTGA R: CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT
<b>HPRT</b>	F: GAAGTCTTGCTCGAGATGTGA R: TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT

As sequências estão representadas na direção 5' → 3'. Os oligonucleotídeos foram validados através do BLAT e BLAT. Os amplicons gerados apresentam um tamanho médio de 100pb. **F:** Forward; **R:** Reverse

#### 3.7.4. Reação da RT-PCR quantitativo

Para a quantificação do produto formado durante a reação de amplificação, foi utilizado o reagente *SYBR®GreenDye* (Applied Biosystems). Este reagente possui intensidade de emissão de fluorescência significativamente aumentada quando ligado à dupla fita de DNA. Assim, quando ligado ao DNA, emite fluorescência no comprimento de onda de 520nm, permitindo a detecção do produto da reação de PCR em tempo real.

Todas as reações foram realizadas em triplicatas em um volume final de 12µl no Termociclador 7300 *Real-Time PCR system* (Life Technologies). Como *template*, foram utilizados 3µl do cDNA sintetizado e diluído 30x em água Milli-Q®. Para cada reação, foram utilizados 3µl do conjunto de *primers* na concentração final previamente determinada (item 4.5.4) e 6µl do reagente *SYBR®GreenDye*. As reações foram realizadas nas seguintes condições: 50°C por 2 min (etapa de ativação da enzima Uracil N-Glicosilase, AmpEraser), 95°C por 10 min (etapa de ativação da enzima DNA Polimerase, Taq Gold), 40 ciclos de 95°C de 15 seg (etapa de desnaturação) e 60°C por 1 min (etapa de anelamento dos oligonucleotídeos e extensão do amplicon). Para avaliar a especificidade das reações de amplificação e detectar a presença de eventual contaminação, uma reação de dissociação do produto amplificado foi realizada ao término de cada reação. Além disso, foram realizadas reações controles de amplificação na ausência de molde (cDNA) denominadas NTC (*Non-template Control*).

Para o gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados, foi utilizado o programa computacional 7300 *System Software* (Life Technologies). Durante análise inicial dos dados, definiu-se um *threshold* na fase exponencial de amplificação do gene. Assim que foi estabelecido o *threshold*, a partir da intersecção deste com a curva de amplificação, obteve-se o Ct da amostra (*Threshold cycle*, ciclo no qual a fluorescência se encontra estatisticamente acima do *background*).

Considerando a possibilidade de variação da concentração inicial de cDNA na análise dos dados provenientes de duas ou mais amostras, foi realizada a normalização na qual a expressão do gene-alvo foi determinada em função da

expressão de genes controles. Assim, a quantificação das amostras foi realizada utilizando-se GAPDH, HPRT e HMBS como controles.

### 3.7.5. Determinação da concentração final de *primers*

A concentração final adequada de cada par de *primers*, específicos para os genes analisados, foi determinada através de reações variando a concentração final máxima destes *primers* entre a máxima de 600nM e a mínima de 200nM. Como *template*, utilizou-se uma mistura de cDNAs provenientes de diferentes linhagens celulares ou tecidos de carcinomas mamários humano. Desta forma, foi possível determinar a menor concentração final de *primers* que resultou na menor formação de dímeros, ou inexistente, sem que houvesse variação no valor do Ct e no perfil da curva de ampliação do gene em relação às maiores concentrações analisadas.

### 3.7.6. Determinação da eficiência dos *primers*

Para calcular a eficiência dos *primers*, foram realizadas reações de PCR quantitativo utilizando-se, como *template*, uma mistura de cDNAs provenientes de diferentes linhagens de mama humana. Através da análise de regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição, foi possível obter o coeficiente angular da reta (a, em  $y=ax+b$ ). Este coeficiente foi, então, utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos *primers*, na seguinte fórmula:

$$E_f = 10^{-1/\text{coeficiente angular}}$$

$$E_f (\%) = (E_f - 1) \times 100$$

### 3.7.7. Confirmação da expressão diferencial

De posse dos Cts, inicialmente foi calculada a média dos Cts das triplicatas. Dado que a expressão do gene é analisada em relação a uma amostra que é tomada como referência, calculou-se, então, a diferença entre a Média dos Cts da amostra referência e a Média dos Cts da amostra estudada. Essa diferença foi definida como  $\Delta C_p$ . O Cálculo do  $\Delta C_p$  foi realizado para os dados do gene-alvo e para os dados do gene de expressão constitutiva. A fórmula final (Plaffl 2001) para o cálculo da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, considerando que pode não ocorrer um ganho de duas vezes do produto amplificado a cada ciclo, dado que a eficiência de amplificação dos *primers* utilizados não é de 100%, é dada por:

$$\text{ratio} = \frac{E_{f(\text{gene alvo})}^{\Delta C_p(\text{gene alvo})}}{\text{Fator de Normalização}}$$

O Fator de Normalização foi calculado através da análise da expressão dos genes GAPDH, HPRT e H-MBS no programa computacional GeNorm (Speleman *et al.*, 2002). De acordo com esta análise, foram classificados os dois genes mais estáveis, GAPDH e HPRT, que foram, então, utilizados para calcular o controle endógeno utilizado como Fator de Normalização no cálculo da expressão diferencial.

### 3.8. Citometria de fluxo

experimentos de citometria de fluxo foram realizados no citômetro FACSAria I/II (BD Bioscience, California, USA) e FACSCalibur (BD Bioscience), seguindo as

recomendações do MIFlowCyt (Lee, Spidlen *et al.*, 2008). Os resultados foram analisados e processados no programa computacional *FlowJo* 7.6.3 (Tree Star INC., USA).

### **3.8.1. Ensaio de citometria de fluxo para caracterização dos marcadores de membrana celular e para análise de células eGFP positivas.**

Para a análise dos marcadores, as linhagens celulares de mama humana foram cultivadas até atingirem 80% da densidade de saturação. Como os marcadores a serem analisados são de superfície celular, optou-se por dissociar as células com Versene 10mM para não danificar a estrutura das proteínas de interesse. Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células foram fixadas por 1h em paraformaldeído 4% e bloqueadas com solução de BSA 5%, seguido da incubação com anticorpo acoplado ao fluoróforo por 1h a temperatura ambiente. Como controle, a mesma quantidade de células de cada linhagem foi incubada somente com PBSA. Após a incubação, as células foram lavadas com PBSA, filtradas em filtro de 70 $\mu$ m e analisadas no citômetro de fluxo. Foram coletados 50.000 eventos por amostra. Foram utilizados controles isotípicos de IgG e IgE ligados aos fluorocromos específicos, como controle negativo em todos os experimentos. A lista de anticorpos está listada no ítem 3.5 e a configuração do aparelho encontra-se no programa MIFlowCyt que está disponível no final desta tese.

Para análise de células eGFP positivas nas linhagens transduzidas com o vetores pLV-eGFP e pLV-eGFP-CD90, as células foram dissociadas com tripsina, ressuspensas em PBSA e analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur. Aproximadamente 10.000 eventos foram analisados utilizando-se o filtro FL-1H para determinação das células verdes.

### 3.8.2. Análise e separação celular de células expressando eGFP

O processo de separação das células transduzidas com vetores contendo eGFP (*green fluorescent protein*) baseou-se na fluorescência verde desta proteína quando submetida a um comprimento de onda entre a luz azul e o ultravioleta. As células dissociadas da placa foram analisadas em citômetro de fluxo e uma carga foi aplicada à gota que continha a célula eGFP positiva. Após a passagem da gota pelas placas defletoras, esta foi desviada e recolhida. As células selecionadas foram, então, coletadas e cultivadas conforme descrito no item 3.2.1. A compensação foi realizada antes de cada experimento de separação de maneira automática no próprio programa FACSDiva 6.0. Controles de CST para a estabilidade dos fotomultiplicadores e Drop-delay foram realizados sempre a cada novo experimento e a pureza das preparações foi aferida após o procedimento através da análise de uma alíquota do *pool* de células separadas.

### 3.9. Construção do vetor lentiviral pLV-EGFP-CD90 para ensaio de super-expressão

#### 3.9.1. Desenho dos *primers* para amplificação da região codificante do CD90

Os *primers* para amplificação foram desenhados utilizando-se a sequência inicial e final do cDNA correspondente à sequência do cDNA de CD90 humano. Foram adicionados os sítios para as enzimas de restrição *Xba*I (TCTAGA) nos *primers forward*, e o sítio *Mlu*I (ACGCGT), nos *primers reverse*, para inserção dos genes de interesse nos respectivos sítios *Xba*I e *Mlu*I do vetor lentiviral.

*Primers* de Clonagem do CD90:

hCD90-F-*Xba*I: TCTAGAATGAACCTGGCCATCAGCATCG

TM=71°C

hCD90-R-*Mlu*I: ACGCGTTCACAGGGACATGAAATCCGT

TM=73°C

### 3.9.2. Amplificação da região codificante do CD90

Cerca de 1,0µg de cDNA da linhagem celular tumorigênica de mama Hs578-T foi utilizada como molde para amplificação da região codificante do gene CD90. Para a reação de amplificação, foram utilizados os seguintes reagentes: 1X *High Fidelity Buffer* (Finnzymes); 2mM de dNTP (Fermentas); 1U de *Phusion® Hot Start High Fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes); *primers* específicos na concentração 0,5µM (*primer forward* e *primer reverse*). As condições de ciclagem no termociclador *PTC-225 Pelthier Thermal Cycler®* (MJ Research) foram: 98 °C por 2 min; 39 ciclos de 98 °C por 10 seg, 72 °C por 30 seg, 72 °C por 2 min e 72 °C por 5 min para extensão final dos fragmentos. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo (0,5µg/mL) e visualizado em transiluminador Ultra Violeta (UV).

### 3.9.3. Clonagem da região codificante do CD90

Os fragmentos correspondentes à região codificante do CD90 amplificados por PCR foram fracionados em gel de agarose para, então, serem cortados e purificados a partir do gel, utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado no espectrofotômetro *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer*.

Para subclonagem do fragmento de interesse no vetor *pGEM®-T Easy* (Promega), foram realizadas reações de ligação com a enzima T4-DNA ligase (kit *pGEM®-T Easy Vector System*), a 16°C por 20h, seguida da inativação enzimática a

65°C por 15 min. Alíquotas da reação de ligação foram utilizadas para transformação de bactérias *E. Coli* DH10b por eletroporação.

#### **3.9.4. Preparo de bactérias *Escherichia coli* eletrocompetentes e transformação por eletroporação com DNA plasmideal**

Para o preparo de bactérias eletrocompetentes, foram inoculados 10mL de cultura recém-cultivada de *E. Coli* DH10b em 1L de meio LB. As bactérias foram incubadas a 37°C, sob agitação, até  $A_{500nm}$  de 0,7 e foram, então, coletadas por centrifugação a 4.000 g por 15 min a 4°C e ressuspendidas em 1L da água Milli-Q® estéril gelada. Foram realizadas três lavagens com 0,5mL de água Milli-Q®, 20mL e 10mL de solução 10% glicerol gelada. Após as lavagens, as bactérias eletrocompetentes foram ressuspendidas, aliqüotadas e estocadas a -70°C.

As bactérias *E. Coli* DH10b eletrocompetentes foram transformadas por eletroporação com as construções plasmideais de interesse como descrito a seguir: Uma alíquota de 2µl da reação de ligação foi adicionada a 40µl de bactérias. Esta mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação (*gap* entre os eletrodos de 2mm). O eletroporador (EC-100, EC Apparatus Corporation) foi ajustado conforme o manual do aparelho para 2.800V, sendo então aplicado o pulso à cubeta. Em seguida, foi adicionado 1mL de meio LB à suspensão bacteriana e esta foi incubada a 37°C sob agitação de 200-250rpm por 1h. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar 1,5% contendo 100µg/mL de ampicilina para obtenção de colônias resistentes ao antibiótico. As placas foram, então, incubadas a 37°C por 16h. Clones bacterianos foram selecionados para verificar a presença do inserto de interesse por PCR de colônia.

### **3.9.5. Rastreamento de clones bacterianos por PCR de colônia**

Clones bacterianos foram isolados e incubados a 37°C por 17h em placa de 96 poços contendo 100µL de meio SuperBroth, suplementado com antibiótico. Após a incubação, 1µl da suspensão de bactérias recombinantes foi adicionada à reação de PCR contendo 1,226µl de H<sub>2</sub>O, 150µl de tampão 10X, 45µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 19µl de dNTP 10mM, 25µl de cada *primer* a 10µM e 10µl de Taq (50U, Invitrogen). As condições de ciclagem do termociclador foram: 95°C por 5min, 40 ciclos de 95°C por 30seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 1min, seguida da extensão final por 5min a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 0.8%, corados com Brometo de Etídeo (0,5µg/mL) e visualizado em transiluminador Ultra Violeta (UV).

### **3.9.6. Preparação de DNA plasmideal em pequena e média escala**

Os clones bacterianos analisados e selecionados foram inoculados em meio LB, suplementado com ampicilina (100µg/mL) e mantidos a 37°C, sob agitação de 200-250rpm por cerca de 16h. Inóculos de 5mL e 50mL foram utilizados, respectivamente, para preparações plasmideais pequenas ou médias. Para as duas preparações foram utilizados kits de purificação seguindo as recomendações do fabricante. Desta forma, foram utilizados o Kit Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), para a preparação dos DNAs plasmideais em pequena escala e o Kit Illustra plasmidPrep Midi Spin Kit (GE Healthcare) para preparação em média escala. As preparações de DNA resultantes foram quantificadas no espectrofotômetro (*Nanodrop Spectrophotometer ND-100*, Thermo Scientific, Wilmington, USA). A sequência íntegra do cDNA do gene CD90 foi extraída do vetor *pGEM®-T Easy* por digestão com as enzimas de restrição *XbaI* e *MluI* (Fermentas), sendo este fragmento então purificado do gel como descrito no item 3.2.5.3.

### **3.9.7. Análise da sequência de nucleotídeos**

A integridade da sequência do cDNA do gene CD90 foi avaliada por sequenciamento de DNA no aparelho *ABI Prism 3700 DNA Analyser* (Applied Biosystema) utilizando-se o Kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystema), conforme especificações do fabricante. As sequências obtidas no sequenciamento foram analisadas e alinhadas utilizando-se os programas *PhredPhrap* (Ewing, Hillier, *et al.*, 1998) e *Blast* (NCBI).

### **3.9.8. Subclonagem da construção no vetor lentiviral de terceira geração**

A construção contendo a sequência completa de nucleotídeos do gene CD90 foi utilizado para a subclonagem nos respectivos sítios de restrição do vetor lentiviral pLV-EGFP e esta construção foi então utilizada no ensaio funcional de superexpressão.

## **3.10. Ensaio funcional**

### **3.10.1. Produção de partículas lentivirais em células 293-T**

As partículas virais recombinantes tanto da inibição quanto da superexpressão foram geradas por meio de transfecção da linhagem empacotadora de vírus 293-T. Foram utilizados os vetores pLV-EGFP-CD90 para produção de partículas virais para o ensaio superexpressão e os vetores do sistema *Mission shRNA*, descrito no item 3.1, para o ensaio de inibição. Para cada uma das construções de interesse, foi utilizada uma placa de 100mm de diâmetro de células 293-T em alta densidade de saturação (80-90%). A proporção dos DNAs plasmideais para a produção dos lentivírus foi calculada de acordo com o protocolo descrito por Tiscornia e colaboradores (Tiscornia *et al.*, 2006). Sendo assim, utilizou-

se 1,1µg do vetor de transferência, 720ng do vetor pMDL, 280ng do vetor pREV e 390ng do vetor pVSVG. Este plasmídeos foram diluídos em 150µl de meio DMEM sem soro. Em outro tubo de microcentrífuga, 10µl do reagente de lipofecção (Lipofectamine 2000-Invitrogen) foram diluídos em 150µl de meio DMEM sem soro para cada ensaio de transfecção. Os conteúdos dos dois tubos foram misturados e incubados por 20 min à temperatura ambiente. Após este período, adicionou-se a mistura lipossomos/DNA ao meio de cultura de células. Após 5h, foi efetuada a troca do meio para início das coletas de partículas virais em 24h. Após a primeira troca de meio depois da transfecção, o sobrenadante de cada placa foi coletado a cada 24h até 72hs após a transfecção. Para tanto, adicionou-se 1ml de DMEM-10%SFB em cada poço. O sobrenadante de cada coleta foi centrifugado a 10.000xg por 5 min à temperatura ambiente para eliminar restos celulares e, em seguida, aliqüotados e congelados à 70°C.

### **3.10.2. Titulação das partículas lentivirais pLV-EGFP para cálculo do título biológico**

As partículas virais produzidas foram tituladas em células da linhagem 293-T conforme descrito por Tiscornia e colaboradores (Tiscornia *et al.*, 2006). Foram preparadas diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  dos meios condicionados por 48h contendo as partículas virais. Para realização da transdução viral, misturou-se 20µl das diluições ou dos meios condicionados originais e 500µl de uma suspensão celular contendo  $1 \times 10^5$  células 293-T em DMEM suplementado com 10% de SFB. Imediatamente após a mistura, as células foram transferidas para poços de uma placa de 24 poços e incubadas por 48h, até o momento da contagem das células fluorescentes. Para contagem estas células foram dissociadas e a porcentagem de células eGFP positivas foi analisada no citômetro de fluxo como descrito no item 3.10.1.

O título de cada preparação viral foi obtido a partir da contagem da proporção de células fluorescentes, utilizando-se a seguinte relação:

$$\text{Título (UFC)} = (P \times N / 100 \times V) \times 1/DF, \text{ onde:}$$

P = % de células EGFP+

N = número de células no momento da transdução ( $10^5$ )

V = volume da diluição usado para a transdução

DF = fator de diluição

### **3.10.3. Transdução viral da linhagem MCF10-A com as partículas lentivirais pLV-EGFP-CD90.**

As células da linhagem MCF10-A foram transduzidas com a preparação lentiviral correspondente ao pLV-EGFP-CD90 e pLV-EGFP. Para infecção, cada construção lentiviral foi misturada com uma suspensão de  $1 \times 10^4$  células para se obter uma multiplicidade de infecção de 10 (Moi: *Multiplicity of Infection*). As células foram, então, plaqueadas em placas de 48 poços e o meio de cultura foi trocado após 20h da transdução. As células EGFP positivas foram selecionadas através da separação celular no citômetro de fluxo (*cell sorting*) como descrito no item 3.10.2 e subcultivadas até que atingissem um número de células suficiente para congelamento em nitrogênio líquido.

### **3.10.4. Transdução viral da linhagem Hs578-T com as partículas lentivirais do sistema *Mission shRNA***

Para infecção da linhagem Hs578-T, foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em placas de 35mm de diâmetro com 50µl das partículas virais concentradas do

sistema *Mission shRNA*. Após incubação das células com as partículas lentivirais por um período de 16 a 18h, o meio de cultura foi renovado. A seleção das células transduzidas foi realizada pela adição de 2µg/mL de puromicina. A escolha desta concentração de antibióticos foi previamente determinada por meio de exposição das células parentais Hs578-T à diferentes concentrações de puromicina (1 a 5µg/ml). Após a seleção, as células foram mantidas até que atingissem um número suficiente para congelamento em nitrogênio líquido.

### **3.10.5. Confirmação da superexpressão e da inibição das linhagens transduzidas**

Para avaliar o nível de mRNA do CD90 nas linhagens transduzidas, foram realizadas reações de qRT-PCR conforme descrito no item 3.9. A expressão protéica foi avaliada tanto por Citometria de Fluxo, como descrito no item 3.10.1, como por Western Blot, descrito no item 3.13.1.

## **3.11. Caracterização das linhagens geradas**

### **3.11.1. Ensaio de Western-blot**

#### **3.11.1.1. Obtenção de extratos proteicos totais**

As linhagens celulares, cultivadas em placas de 100mm de diâmetro (p100), foram lavadas com PBSA gelado e incubadas em solução de lise (M-PER<sup>®</sup> Mammalian Protein Extraction Reagent Thermo, Thermo Cientific) contendo inibidores de proteases e fosfatase (Halt<sup>®</sup> Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Cientific) conforme a descrição do fabricante. O lisado foi centrifugado a 14.000g por 10 minutos para retirada dos “debris” celulares. A concentração das proteínas nos extratos foi determinada pelo método de Bradford

(Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), utilizando-se uma curva padrão de BSA (albumina sérica bovina).

### **3.11.1.2. Fracionamento de proteínas por eletroforese em gel de acrilamida e transferência para membrana de nitrocelulose**

Alíquotas de igual massa (10µg) dos extratos protéicos foram submetidas ao fracionamento em gel vertical contendo 10% poliacrilamida – SDS à uma voltagem constante de 150V durante 2h. Em seguida, as amostras fracionadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por transferência úmida (300mA por 2h) em tampão de transferência (0,3% de Tris; 1,44% de glicina; 0,1% de SDS e 20% metanol).

### **3.11.1.3. Incubação das membranas com anticorpos específicos**

Inicialmente para inibição da marcação de sítios inespecíficos, a membrana foi bloqueada com solução de bloqueio (PBSA, 5% de leite em pó desnatado, 0,1% Tween20), por 1h a temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi submetida à três lavagens de 5 minutos cada com solução de lavagem (PBSA 0,1% Tween 20), sendo, então, incubada com o anticorpo primário de interesse na diluição final de 1:1.000 em solução de bloqueio, à 4°C, overnight. Posteriormente, a membrana foi lavada novamente, conforme descrito anteriormente, e incubada com o anticorpo secundário, anti-igG conjugado com peroxidase diluído 2.000 vezes em solução de bloqueio. Após 2h de incubação à 4°C, a membrana foi lavada e a atividade da peroxidase foi detectada por quimioluminescência utilizando-se o Kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante. Os anticorpos foram removidos da membrana utilizando-se o tampão Restore Stripping (Thermo Scientific). A

membrana foi então lavada três vezes por 10 minutos cada, re-incubada com solução de bloqueio e depois incubada com o novo anticorpo primário. Como controle, as membranas foram testadas com anticorpo monoclonal anti- $\beta$ -actina. As imagens das bandas foram quantificadas por densitometria, utilizando-se o software ImageJ 1.46r (National Institutes of Health, [NIH]). A expressão diferencial foi analisada pela relação dos valores da densitometria dos anticorpos primários específicos pelos valores do controle dos mesmos extratos protéicos. Os anticorpos utilizados estão descritos no ítem 3.5.

### **3.11.2. Ensaio de gene repórter**

Com intuito de analisar o elemento responsivo do fator de transcrição AP-1 nas linhagens MCF10A-CD90+, MCF10A-controle e Parental, foi realizado ensaio de gene repórter utilizando o vetor pGL4.44[*luc2P/AP1*]. Como controle experimental, foram utilizados os vetores pGL3 e pRL-TK. Primeiramente,  $2 \times 10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços em triplicata para cada condição experimental. Após 24h, para cada preparação foi diluído 0,8 $\mu$ g do vetor pGL4.44, 0,65 $\mu$ g do pGL3 e 0,15 $\mu$ g do vetor pRL-TK em 50 $\mu$ l de DMEM/F12 sem SFB. Em outro tubo, para cada reação, 2 $\mu$ l do reagente de lipofecção (Lipofectamine 2000 – Invitrogen) foram diluídos em 50 $\mu$ l de DMEM/F12 sem SFB. Os conteúdos dos dois tubos foram então misturados e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente, para, em seguida, adicionar esta mistura ao meio de cultura das células. Cerca de 5h após a transfecção, o meio de cultura foi trocado para meio sem soro com e sem o fator de crescimento EGF. Após 48h, a atividade da luciferase foi analisada utilizando-se o Kit *Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System* (Promega), seguindo-se as especificações do fabricante. A leitura da atividade da luciferase foi feita no aparelho

SpectraMax® *Paradigm Multi-Molde Microplate Detection Platform* (Molecular Devices, California, USA) no comprimento de onda entre 560-480nm.

### **3.11.3. Ensaio de crescimento em substrato sólido**

Para caracterizar o tempo de dobramento das linhagens geradas, cerca de  $5 \times 10^3$  células das linhagens MCF10-A e Hs578-T transduzidas e das respectivas parentais foram cultivadas em placas de 96 poços. Após 72h, o número de células foi determinado utilizando-se o Kit *CyQuant Cell Proliferation Assay* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O número de células foi calculado através de uma curva padrão de intensidade de fluorescência versus densidade celular conhecida, fazendo-se uma curva padrão para cada linhagem celular. Os cálculos para determinar o tempo de dobramento de cada uma destas linhagens foram baseados na seguinte fórmula:  $A = A_0 * 2^n$ , onde A = número final de células,  $A_0$  = número de células iniciais (plaqueadas) e n = número de divisões. O tempo de dobramento (TD) foi calculado dividindo-se o tempo de incubação pelo número de divisões.

### **3.11.4. Ensaio de formação de colônia em meio semi-sólido**

O potencial tumorigênico das linhagens transduzidas e parentais foi determinado indiretamente, através de ensaios de crescimento em suspensão de agarose. Cada poço de placas de 24 poços foi preenchido com 500µl de solução semi-sólida de agarose 0,6% e meio de cultura específico. Sobre esta camada semi-sólida, foram plaqueados 100µl de meio de cultura contendo células isoladas diluídas nas concentrações  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  células/mL em meio de cultura, em triplicata. Rapidamente, para evitar a adesão das células, foram adicionados 500µl de solução semi-sólida de agarose 0,3% em meio de cultura específico para cada

linhagem. 14 e 21 dias após o plaqueamento, as colônias foram fixadas adicionando-se 100µl de formaldeído 37%, fotografadas e contadas utilizando-se o microscópio EVOS FI Fluorescence imager (Life Technologies) aumento de 100X.

### **3.11.5. Ensaio de migração e invasão celular *in vitro***

O potencial invasivo das linhagens celulares transduzidas e das respectivas linhagens parentais foi analisado através de ensaios de invasão *in vitro* em placas do tipo *Transwell*® (Corning), utilizando-se membrana basal reconstituível (*Matrigel*<sup>TM</sup>) como substrato para invasão. Foram utilizadas placas de 12 poços contendo insertos de membrana de policarbonato porosa de 12mm de diâmetro com poros de 8µm contendo ou não *Matrigel*<sup>TM</sup>. Previamente ao ensaio, as células foram carenciadas para soro por aproximadamente 12h. Posteriormente, as células foram dissociadas com solução de tripsina e contadas. Cerca de  $1 \times 10^5$  células em 500µl de meio de cultura sem soro foram plaqueadas sobre as membranas porosas contendo ou não *Matrigel*<sup>TM</sup>. No compartimento inferior de cada poço, foram adicionados 700µl de meio de cultura contendo alta concentração de soro (10%), quimioatraente para migração/invasão das células através dos poros das membranas.

Após 24h e 48h, os insertos foram fixados em solução de formaldeído 3,7% em PBSA por 20min á temperatura ambiente. Em seguida, os insertos foram lavados em PBSA e incubados em metanol absoluto por 10 minutos. As células foram, então, coradas em solução de Coomassie (Coomassie Blue:metal:ácido acético [45:45:10]). As células que não atravessaram a membrana porosa, bem como a camada de complexo protéico (*Matrigel*<sup>TM</sup>), foram removidas com auxílio de hastes flexíveis de algodão (Cotonete®). Após secagem, as membranas foram fotografadas em

microscópio EVOS FI Fluorescence imager (Life Technologies) em aumento de 100X.

### **3.11.6. Ensaio de metástase experimental em ratos *nude*.**

Ratos imunodeficientes do tipo *nude*, de 14 a 18 semanas de idade foram utilizados. Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células das linhagens parentais e transduzidas, mantidas em suspensão de 100  $\mu$ l de PBSA, foram injetadas na veia lateral da cauda dos camundongos. 45 dias após a injeção, os animais foram sacrificados e examinados quanto ao número de colônias superficiais detectadas no pulmão. Os pulmões coletados foram, então, fixados em solução de formaldeído 3,7% em PBSA por, aproximadamente, 12h à 5°C, e mantidos em solução de etanol 70% para posterior registro fotográfico.

Toda a metodologia aplicada para o estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovada pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal (CECUA) do IQ-USP.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise da expressão de mRNA de marcadores de células-tronco nas linhagens de mama

Em busca de marcadores de células-tronco que pudessem estar relacionados com a grau de malignidade no câncer mama, foram analisados, através da técnica de RT-PCR quantitativo, a expressão relativa do mRNA de dez marcadores de células-tronco nas linhagens tumorigênicas de carcinoma mamário e na linhagem não-tumorigênica de mama. Os resultados dos ensaios de RT-PCR quantitativo representam os valores médios obtidos das triplicatas provenientes de três experimentos independentes. Os valores estão representados na forma de expressão gênica relativa, calculada conforme descrito em Materiais e Métodos, sendo, a linhagem não-tumorigênica de mama, MCF10-A, tomada como referência. Os níveis de HMBS foram classificados como menos estáveis, em comparação aos de GAPDH e HPRT, portanto, os resultados representados são aqueles normalizados pela expressão gênica apenas de GAPDH e HPRT. O cálculo da eficiência dos *primers* foi determinado através da análise das curvas de regressão linear obtidas em condições experimentais específicas (Tabela 6).

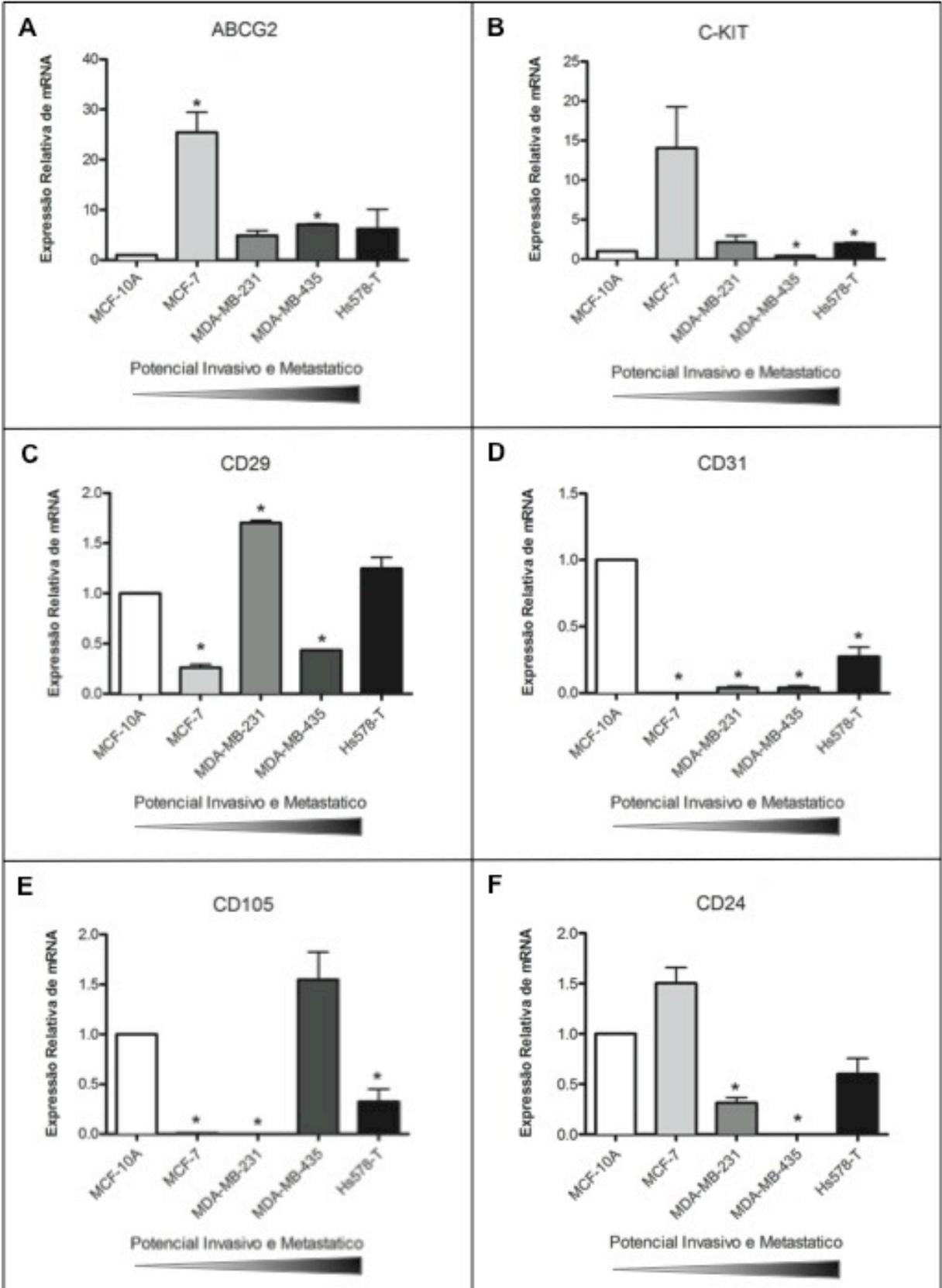
**Tabela 7: Concentração final de primers utilizados nas reações de qRT-PCR**

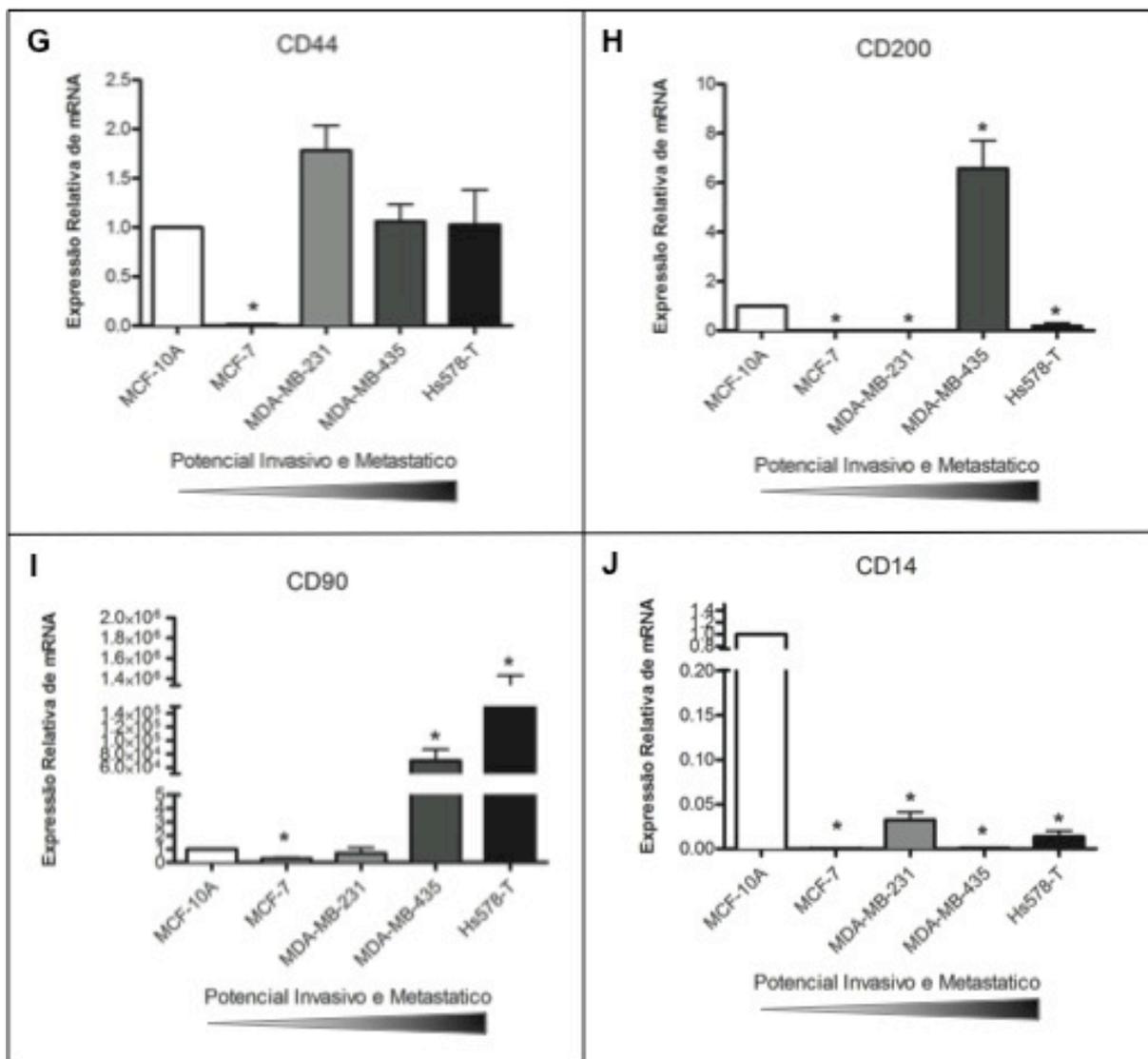
PRIMER	Concentração (nM)	Coefficiente angular	Eficiência (%)
ABCG2	600	-3,87	81
C-KIT	400	-3.21	100
CD14	400	-3.20	100
CD24	400	-3.58	90
CD29	400	-3.39	97
CD31	600	-3.40	97
CD44	200	-3.44	95
CD90	400	-3.22	100
CD105	400	-3.56	91
CD200	600	-3.36	98
gapdh	600	-3.45	95
hprt	600	-3.39	97
hmbs	600	-3.77	81

*Coefficiente angular das regressões lineares utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos primers como descrito em Material e Métodos.*

A partir da análise do qRT-PCR, foi observado que o nível da expressão relativa do marcador *ABCG2* mostrou-se mais elevado na linhagem MCF-7 de câncer de mama que é não-invasiva e não-metastática (Figura 6A; MCF10-A vs MCF-7  $25 \pm 2$  [Média $\pm$ EPM];  $p < 0,05$ ). De modo similar, foi observado um aumento da expressão gênica do *c-KIT* na mesma linhagem, entretanto, este aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 4.1B; MCF10-A vs MCF-7  $13 \pm 3$  [Média $\pm$ EPM];  $p < 0,05$ ). Também foi possível detectar a expressão de *CD29* (Figura 6C), *CD31* (Figura 6D), *CD105* (Figura 6E), *CD24* (Figura 6F) e *CD44* (Figura 6G) tanto na linhagem normal MCF10-A como em pelo menos uma linhagem tumoral. A expressão do *CD200* apresentou-se significativamente aumentada na linhagem de carcinoma mamário MDA-MB-435 (Figura 4.1H; MCF10-A vs MDA-MB-435  $5,6 \pm 0,6$  [Média $\pm$ EPM];  $p < 0,05$ ). Por sua vez, os níveis de mRNA do *CD90* apontaram superexpressão estatisticamente significativa na linhagem celular Hs578-T de

carcinoma mamário, que apresenta caráter mais invasivo e metastático (Figura 6I; MCF10-A vs Hs578T  $1,676.000 \pm 96795$  [Média $\pm$ EPM];  $p < 0,05$ ). Já o CD14 mostrou-se altamente expresso na linhagem não-tumorigênica MCF10-A (Figura 6J; MCF10-A vs MCF-7:  $0.00030 \pm 0.00002$ ; vs. MB-MDA-231:  $0.032 \pm 0.005$ ; vs. MB-MDA-435:  $0.00080 \pm 0.00007$ ; Hs578-T:  $0.014 \pm 0.004$  [Média $\pm$ EPM];  $p < 0,05$ ).





**Figure 6: Análise de qRT-PCR da expressão dos marcadores de células-tronco em linhagens tumorais e não tumorigênica de mama.**

As linhagens celulares foram cultivadas conforme descrito em Material e Métodos. Após atingirem 80% de confluência, o RNA total foi extraído e os níveis de expressão de diferentes marcadores de células tronco foram analisados por qRT-PCR: **A) ABCG2**, **B) C-KIT**, **C) CD29**, **D) CD31**, **E) CD105**, **F) CD24**, **G) CD44**, **H) CD200**, **I) CD90**, **J) CD14**. A expressão é relativa a linhagem não-tumorigênica MCF10-A. Os genes endógenos utilizados para a normalização foram *GAPDH* e *HPRT*. Os asteriscos mostram a diferença de expressão estatisticamente significativa ( $P < 0.05$ ). O qRT-PCR foi realizado em triplicatas ( $n=3$  experimentos independentes).

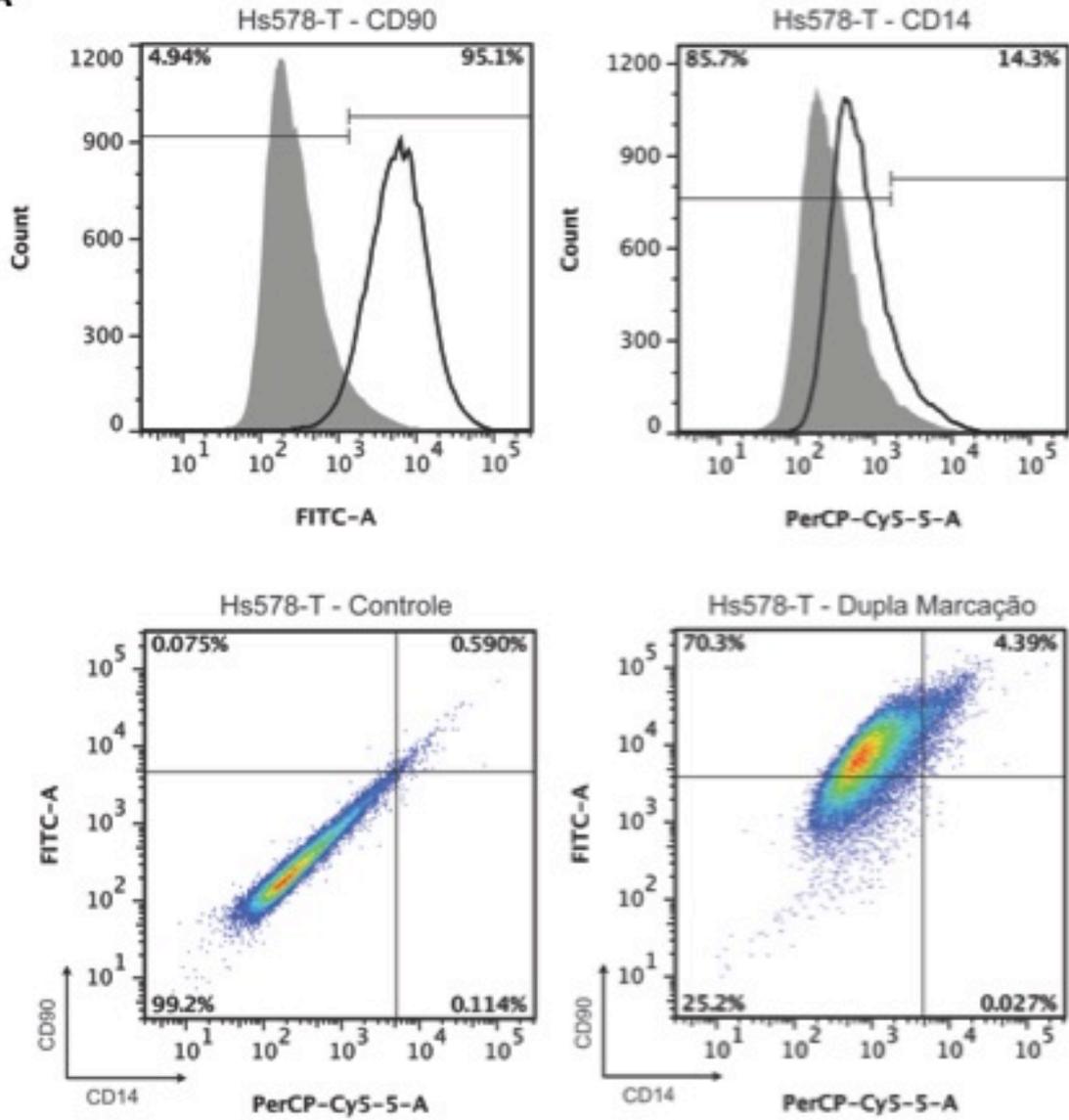
De modo geral, através da análise da expressão do mRNA, foi possível observar que, dentre os 10 marcadores estudados, o CD90 e o CD14 foram os mais interessantes por estarem diferencialmente expressos de acordo com o grau de malignidade das linhagens mamárias analisadas.

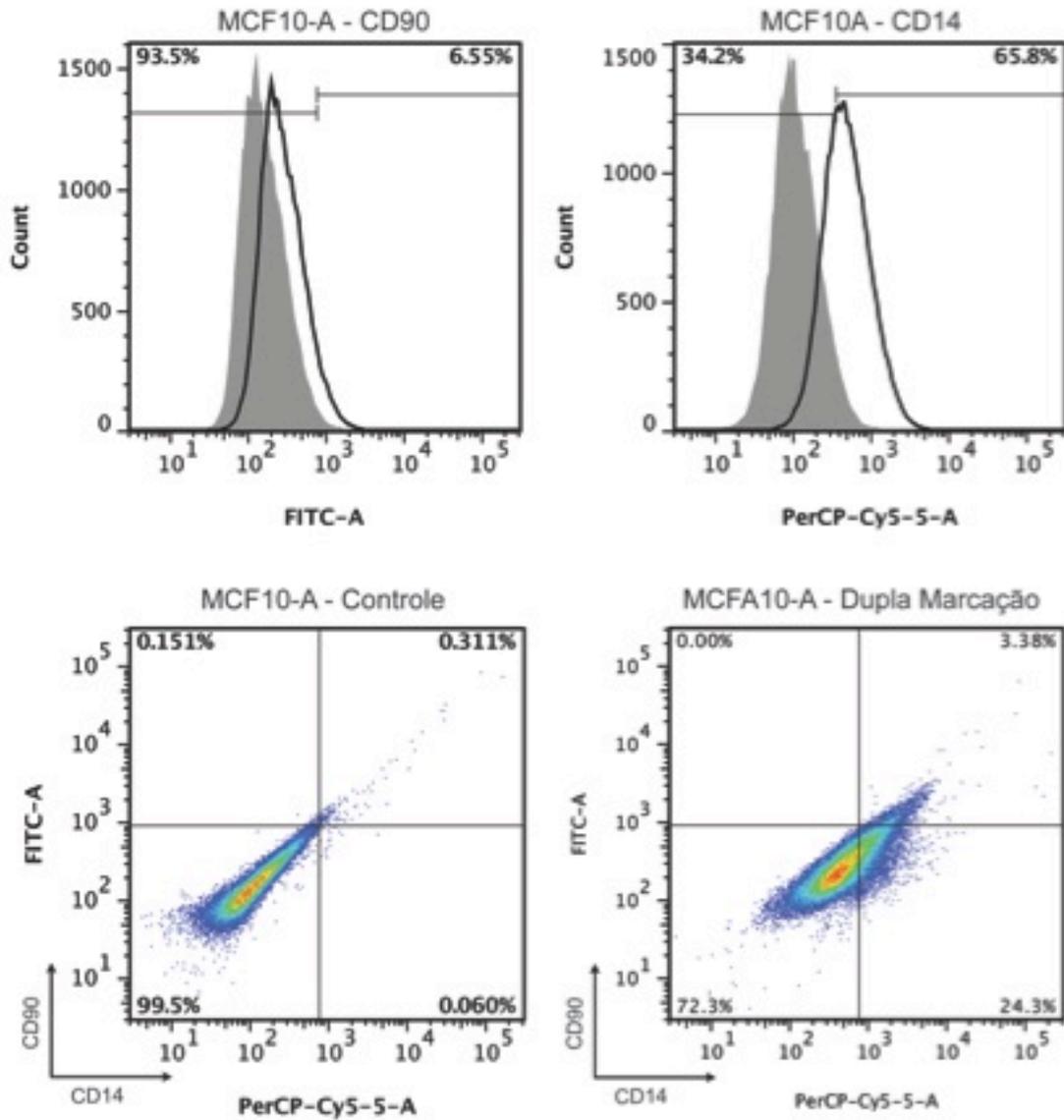
#### **4.2. Análise da expressão proteica dos marcadores de células-tronco nas linhagens de mama**

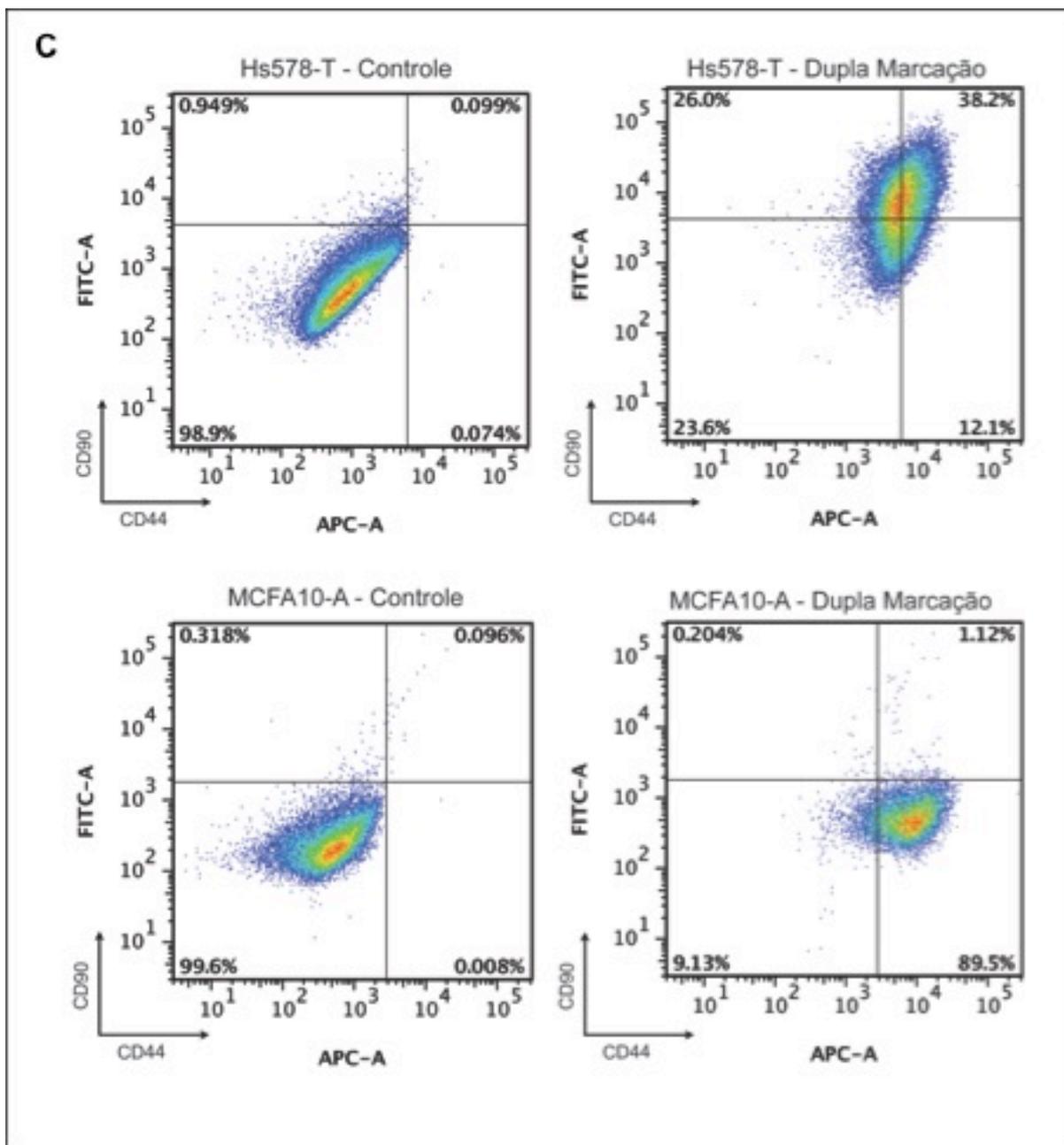
Com o intuito de investigar o nível da expressão protéica dos marcadores diferencialmente expressos identificados na análise do RT-PCR quantitativo, foi utilizado citometria de fluxo com o mesmo painel de linhagens celulares.

Conforme o que foi observado na análise do mRNA, os resultados da análise protéica mostrou que a linhagem mais agressiva, Hs578-T, apresentou mais de 90% das células expressando o marcador de membrana CD90, com menos de 15% das células expressando o marcador de superfície CD14 (Figura 7A). O oposto foi observado na linhagem MCF10-A, na qual foi encontrado menos de 7% da população positiva para o CD90 e mais de 60% de células positivas para o CD14 (Figura 7B). Por sua vez, o CD44, marcador clássico de células-tronco tumorais de mama, apresentou um padrão menos específico, mostrando-se positivo em uma significativa subpopulação tanto na linhagem MCF10-A (Figura 7C) quanto na Hs578-T (Figura 7D).

Interessantemente, , as outras linhagens celulares, ou seja: MCF-7 (Figura 7E), MDA-MB-231 (Figura 7F) e MDA-MB-435 (Figura 7G), apresentaram níveis de expressão intermediários desses dois marcadores, como pode ser visto nos respectivos histogramas.

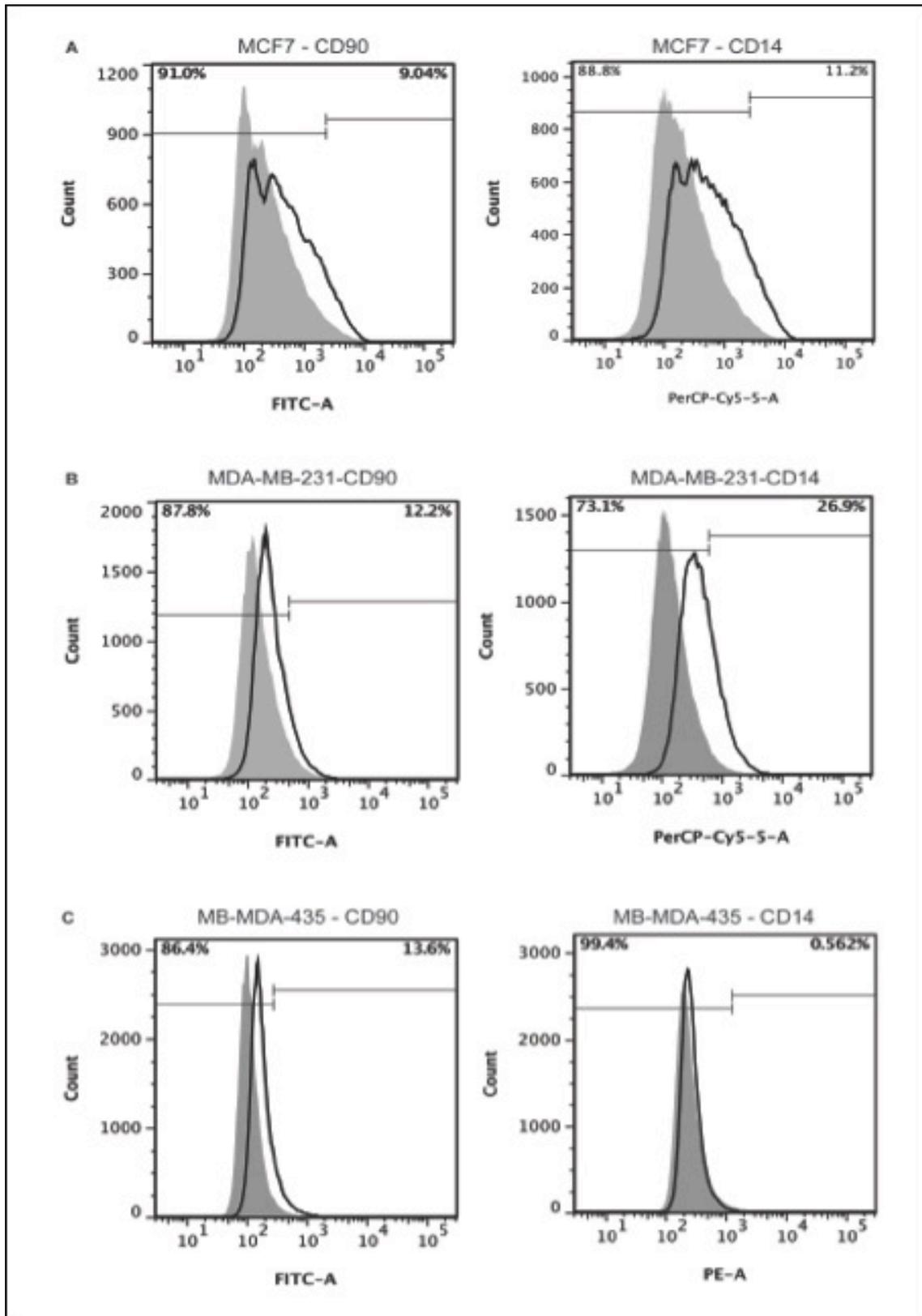
**A**

**B**



**Figure 7: Análise dos marcadores de células tronco na linhagem normal e tumoral de mama.**

MCF10-A e Hs578-T foram mantidas em cultura como descrito em Material e Métodos. Cerca de  $10^6$  células, mantidas em suspensão, das linhagens Hs578-T (A) e MCF10A (B) foram marcadas com anticorpos anti-CD90 e anti-CD14. A mesma proporção de células de cada linhagem foi duplamente marcada com CD90/CD44 (C). As linhagens foram analisadas no citômetro de fluxo FACSaria I. Os *gates* foram desenhados no programa computacional *FlowJo 7.6* tendo, como referência, as células não-marcadas de cada linhagem. A porcentagem de subpopulações celulares positivas e negativas estão indicadas nos quadrantes de cada gráfico e estão descritas no MIFlowCyt-item 4.4.2.

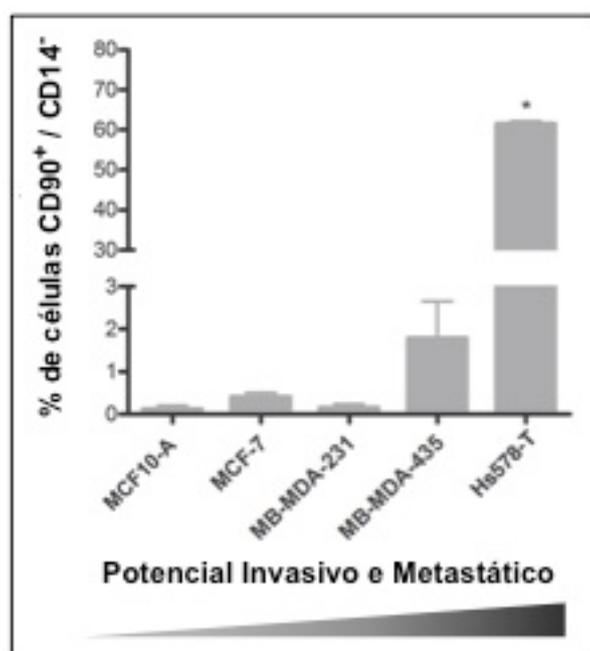


**Figure 8: Análise dos marcadores CD90 e CD14 nas linhagens tumorais de mama.**

Cerca 10<sup>6</sup> células em suspensão da linhagem MCF7 (A) e MB-MDA-231 (B) e MB-MDA435 (C) foram marcadas com anticorpos anti-CD90 e anti-CD14. As linhagens foram analisadas no citômetro de fluxo FACSAria I. Os *gates* foram desenhados no programa computacional

*FlowJo 7.6* tendo, como referência, as células não-marcadas de cada linhagem. A porcentagem de subpopulações celulares positivas e negativas estão indicadas nos quadrantes de cada gráfico e estão descritas no MIFlowCyt-item 4.4.2.

Em conjunto, os resultados demonstraram que o fenótipo CD90<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup> mostrou ser eficiente para diferenciar completamente a linhagem não-tumorigênica MCF10A da linhagem mais agressiva Hs578-T (Figura 9).



**Figure 9: Porcentagem da subpopulação celular nas linhagens de mama.**

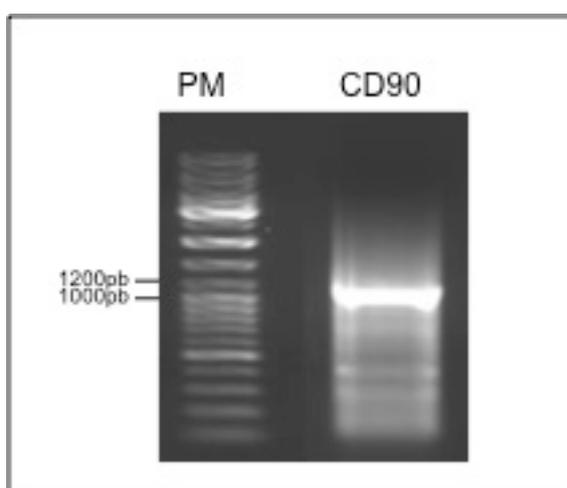
Porcentagem da subpopulação celular CD90<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup> nas linhagens celulares MCF10-A, MCF-7, MB-MDA-231, MB-MDA-435 e Hs578-T. Cerca de 10<sup>6</sup> células em suspensão da linhagem MCF7 **(A)** e MB-MDA-231 **(B)** e MB-MDA435 **(C)** foram marcadas com anticorpos anti CD90 e CD14. As linhagens foram analisadas no citômetro de fluxo FACSAria I. Os *gates* foram desenhados no programa computacional *FlowJo 7.6* tendo, como referência, as células não marcadas de cada linhagem. A porcentagem das subpopulações celulares positivas e negativas estão

### 4.3. Análise funcional de CD90 na linhagem normal MCF10-A e na linhagem tumoral Hs578-T

Os resultados obtidos na análise dos marcadores de células-tronco nas linhagens celulares de mama indicaram que o CD90 pode estar relacionado com o grau tumorigênico no câncer de mama. Visando investigar o papel deste marcador durante a transformação maligna, foi realizado o ensaio funcional tanto na linhagem mais tumorigênica (Hs578-T) como na linhagem não-tumorigênica (MCF10-A).

#### 4.3.1 Superexpressão do marcador CD90 na linhagem MCF10-A

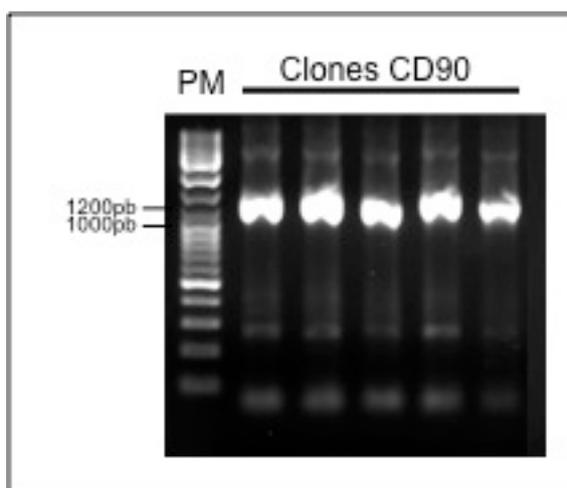
O vetor pLV-eGFP-CD90 utilizado foi construído no laboratório a partir de *primers* específicos. Para amplificação da região codificante do gene CD90 foi utilizado, como molde, DNA da linhagem celular tumorigênica de mama Hs578-T. Através da técnica de PCR, foi possível amplificar os fragmentos de cDNA de 1.128pb do *CD90* (Figura 10).



**Figure 10: Amplificação do cDNA de CD90 humano.**

Gel de agarose 0,8% para visualização do fragmento amplificado de CD90 de 1128pb.

Estes fragmentos foram purificados e subclonados em vetor *pGEM®-T Easy*. Através da técnica de PCR de colônia, foi verificada a presença do inserto de interesse nos clones bacterianos gerados (Figura 11). Os fragmentos obtidos apresentaram o tamanho esperado, levando-se em conta que os *primers* para o vetor *pGEM®-T Easy* aumentam o tamanho do fragmento em cerca de 280pb.



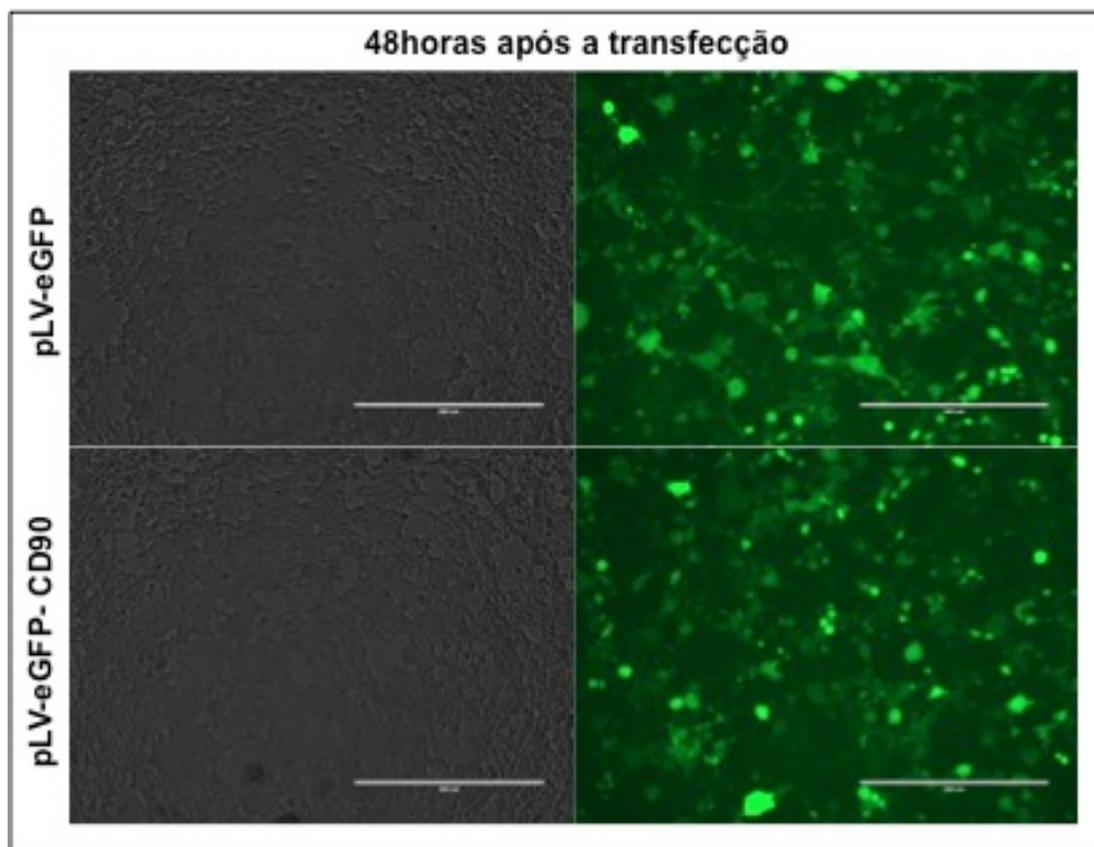
**Figure 11: PCR de colônia dos clones obtidos para CD90.**

Gel de agarose 1,2% para visualização dos insertos amplificados a partir de PCR de colônia das bactérias obtidas por eletroporação com o vetor *pGEM* contendo o gene de interesse. PM: padrão de peso molecular.

Após a confirmação da sequência correta do CD90 por sequenciamento e análise de Bioinformática, os plasmídeos foram digeridos e purificados do gel para a subclonagem nos respectivos sítios de restrição do vetor lentiviral visando a superexpressão deste gene (Figura não mostrada).

Assim, as partículas virais recombinantes foram geradas por meio de transfecção da linhagem 293-T. As células transfectadas foram analisadas após 48h através de microscopia de fluorescência quanto à expressão do gene repórter eGFP. O meio condicionado foi coletado conforme descrito em Material e Métodos. A

presença da fluorescência verde nas células indica que as partículas lentivirais foram geradas de forma eficiente (figura 12).



**Figure 12: Células 293-T transfectadas com as construções para produção de partículas lentivirais.**

Os vetores foram transfectados em células 293-T. Após 48h de transfecção, as células foram observadas ao microscópio de fluorescência (100x de aumento) utilizando luz visível (painel esquerdo) e fluorescência a 509nm (painel direito).

Para o cálculo do título das partículas lentivirais, células da linhagem 293-T foram transduzidas. Por análise de citometria de fluxo, foi possível observar que cerca de 12% das células transduzidas eram eGFP positivas (Figura 13). A partir desta porcentagem, foi realizado o cálculo do título viral, conforme descrito em Material e Métodos.

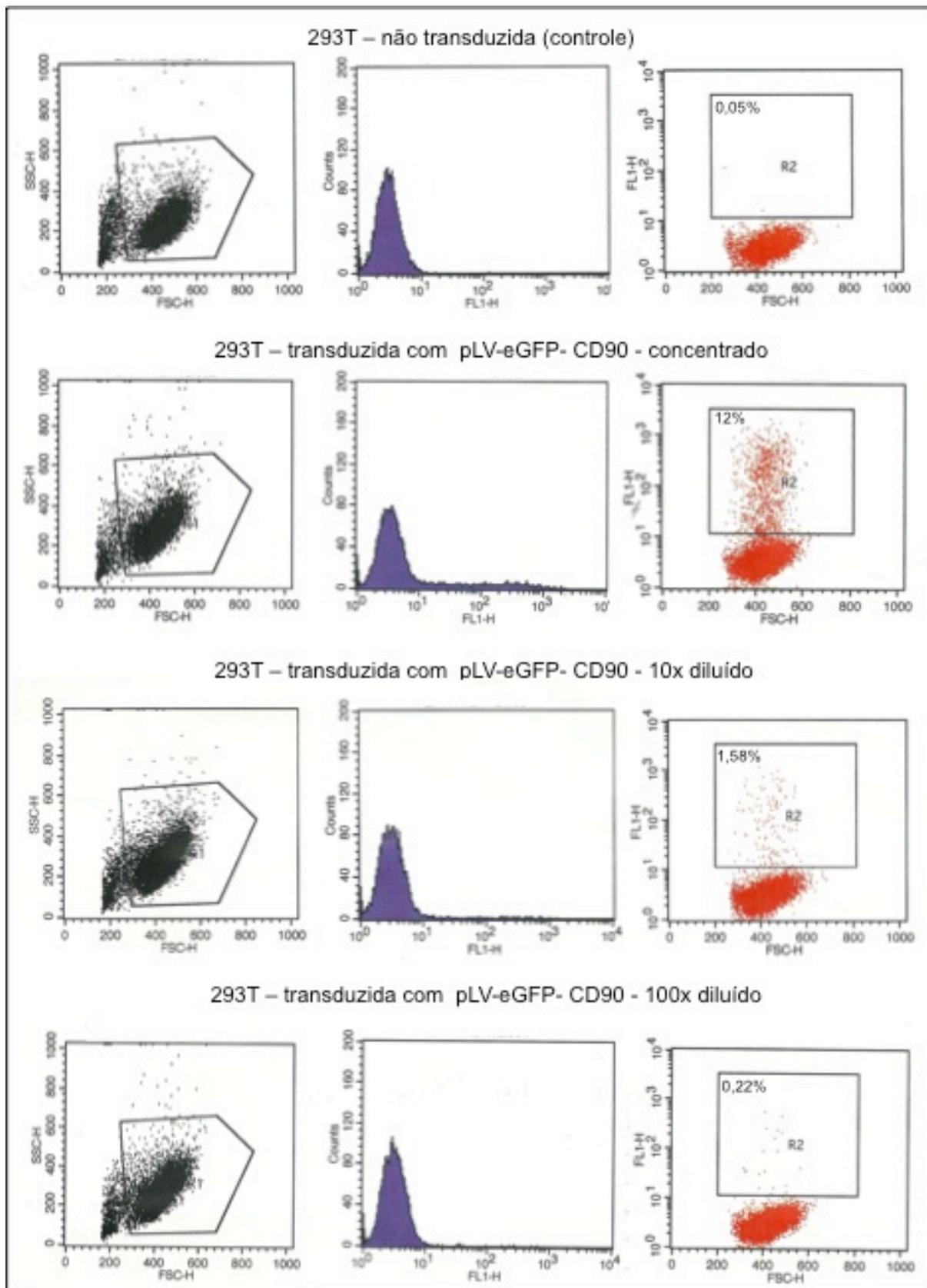
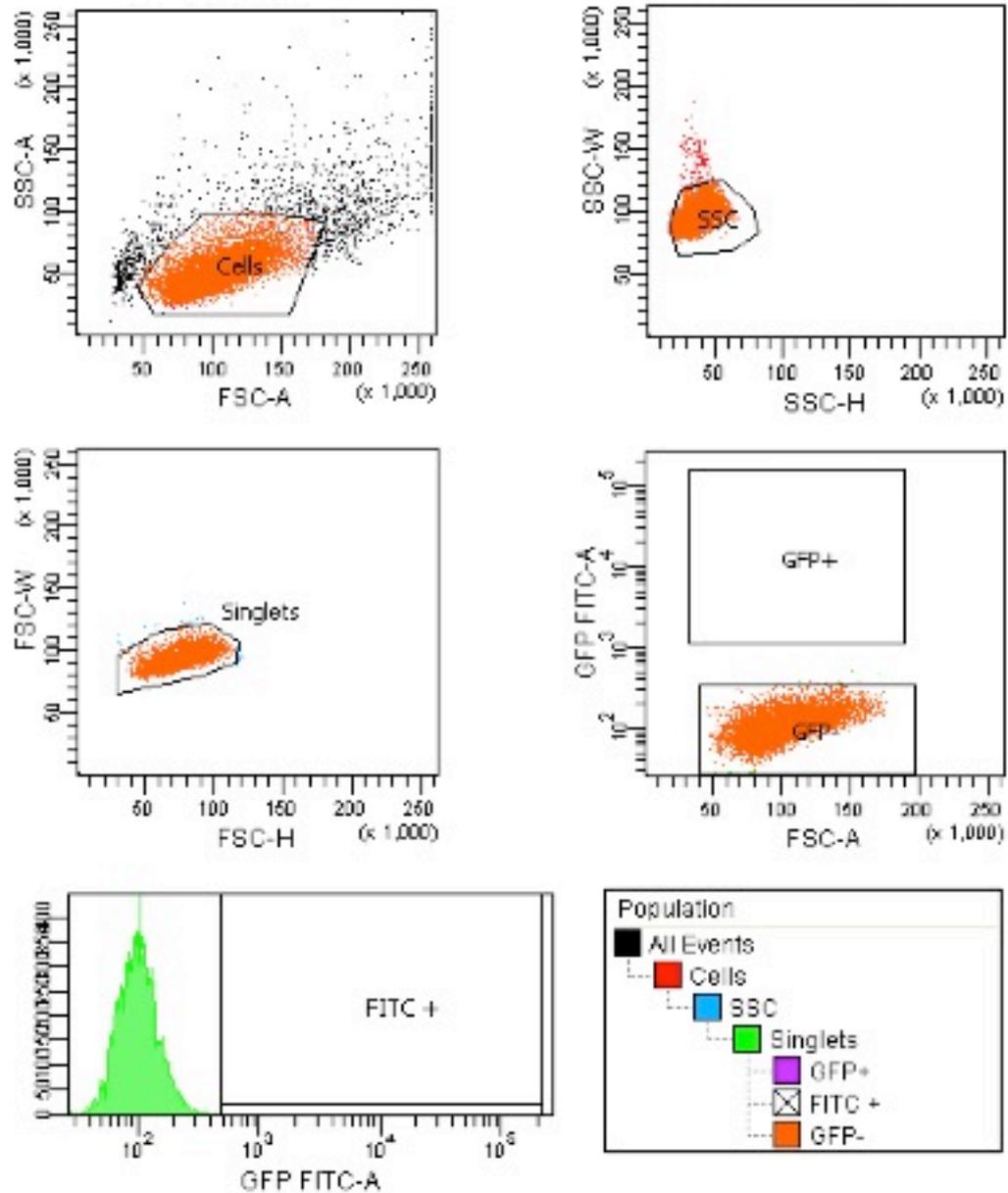


Figure 13: Contagem, por citometria de fluxo, das células 293-T fluorescentes transduzidas com os vetores pLV-eGFP e pLV-eGFP-CD90.

As células foram transduzidas com os meios condicionados concentrados e diluídos contendo as partículas lentivirais. Após 48h, as células foram dissociadas e as células fluorescentes foram contadas no citômetro de fluxo. O título foi obtido a partir da contagem da proporção das células fluorescentes e da utilização da seguinte relação: Título (UFC) =  $(P \times N / 100 \times V) \times 1/DF$ , onde P=% de células eGFP+, N=número de células no momento da transdução ( $10^5$ ), V=volume da diluição usado para a transdução e DF=fator de diluição.

A partir do cálculo do título, foi utilizado multiplicidade de infecção (Moi) de 10 das partículas lentivirais contendo o vetor pLV-eGFP-CD90 para transduzir a linhagem não-tumorigênica MCF10-A, visando, assim, obter a superexpressão do marcador CD90 nesta linhagem. O mesmo Moi foi utilizado para transduzir a MCF10-A com o vetor controle pLV-eGFP. Após a transdução, observou-se aproximadamente 5% de células eGFP positivas na linhagem transduzida com o vetor controle e cerca de 18% na linhagem transduzida com o vetor pLV-eGFP-CD90. Apesar do baixo rendimento, foi possível selecionar a subpopulação eGFP positiva dessas linhagens através da técnica de “cell sorting”, como mostrado na Figura 14 (pLV-eGFP) e 15 (pLV-eGFP-CD90).

MCF10A não transduzida (Controle)



Population	#Events	%Parent	Mean
All Events	10,000	###	122
Cells	8,829	88.3	
SSC	8,698	98.5	105
Singlets	8,662	99.6	105
GFP+	0	0.0	###
FITC +	1	0.0	481
GFP-	8,650	99.9	105

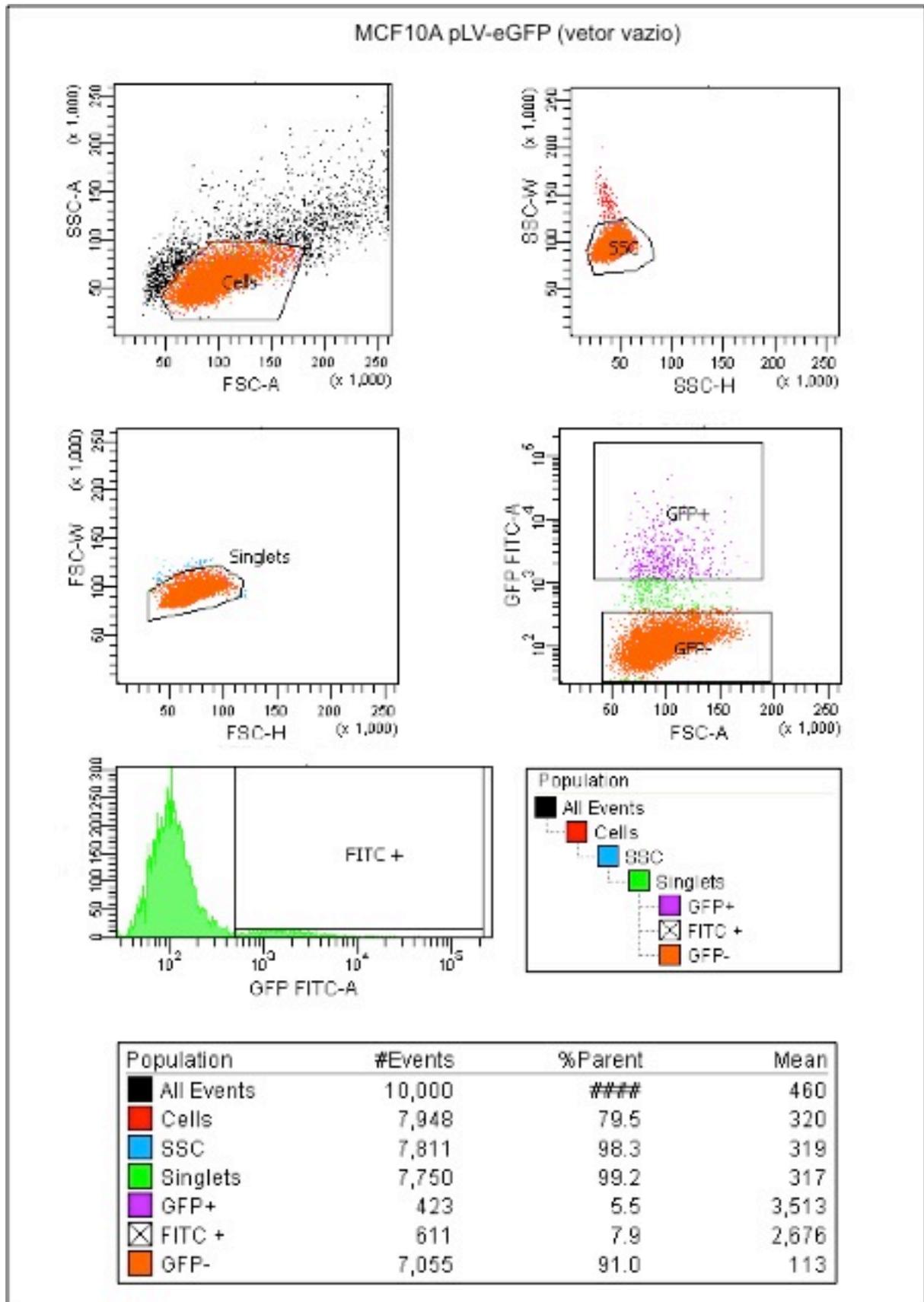
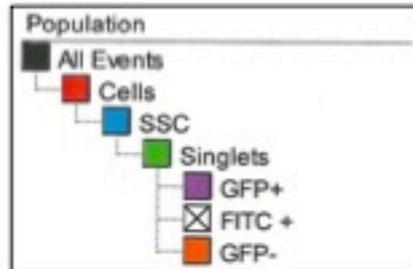
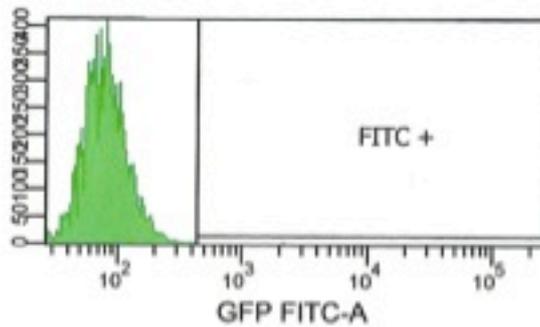
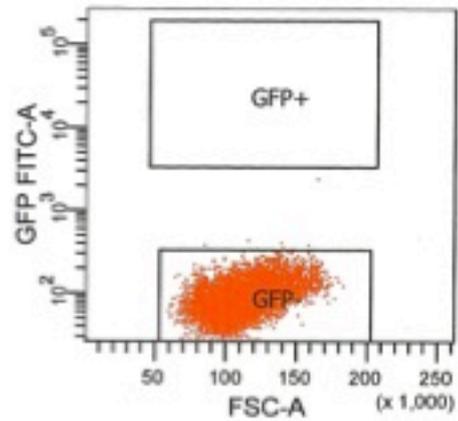
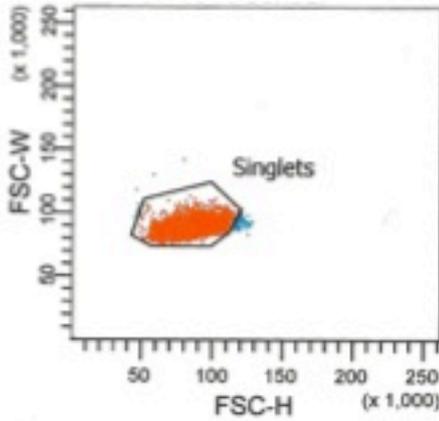
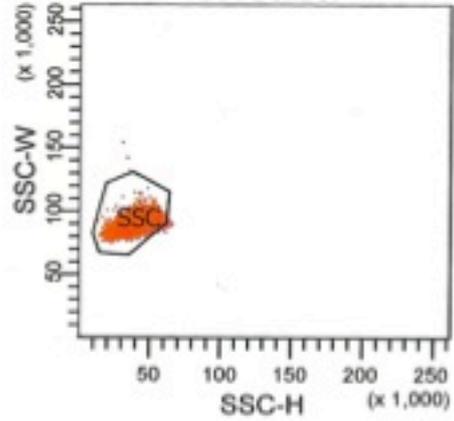
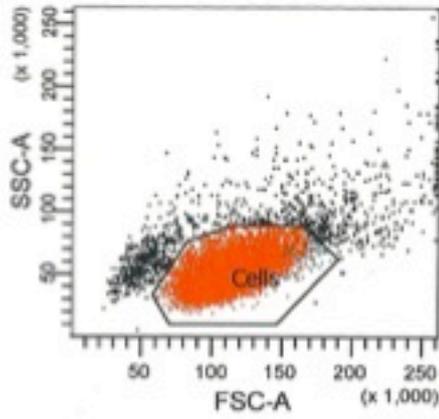


Figure 14: Separação das células MCF10A fluorescentes transduzidas com pLV-eGFP (vetor vazio).

As células foram transduzidas utilizando  $moi=10$  das partículas lentivirais. Após a transdução, as células foram dissociadas e as células eGFP+ foram isoladas do restante da população através de citometria de fluxo no FACSAria II. A compensação foi realizada antes de cada experimento de maneira automática no próprio programa FACSDiva 6.0. A pureza das preparações foi aferida após o procedimento através da análise de uma alíquota do *pool* de células separadas.

MCF10A não transduzida (Controle)



Population	#Events	%Parent	Mean
■ All Events	10,000	####	96
■ Cells	8,942	89.4	87
■ SSC	8,892	99.4	87
■ Singlets	8,762	98.5	86
■ GFP+	0	0.0	####
⊠ FITC +	1	0.0	2,209
■ GFP-	8,757	99.9	86

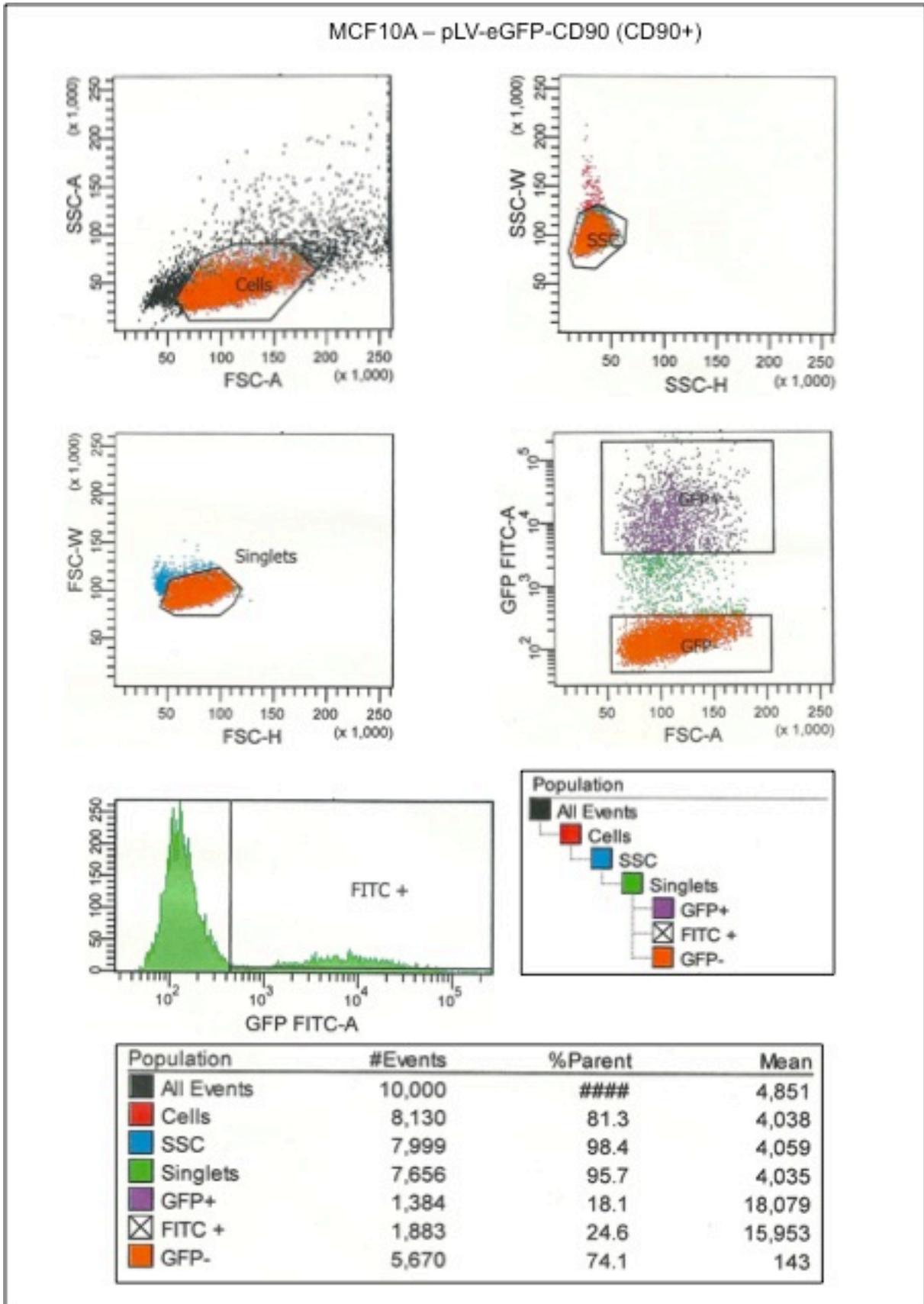
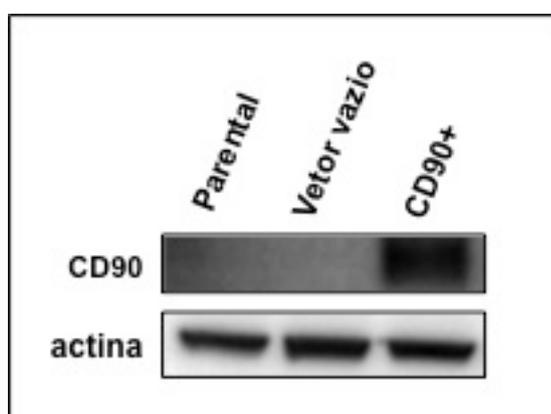


Figure 15: Separação das células MCF10A fluorescentes transduzidas com pLV-eGFP-CD90 (CD90+).

As células foram transduzidas utilizando-se moi=10 das partículas lentivirais. Após a transdução, as células foram dissociadas e as células eGFP+ foram isoladas do restante da população no citômetro de fluxo FACSAria II. A compensação foi realizada antes de cada experimento de maneira automática no próprio programa FACSDiva 6.0. A pureza das preparações foi aferida após o procedimento através da análise de uma alíquota do pool de células separadas.

A expressão proteica do marcador CD90 das linhagens selecionadas foi confirmada utilizando a técnica de Western Blot (Figura 16).



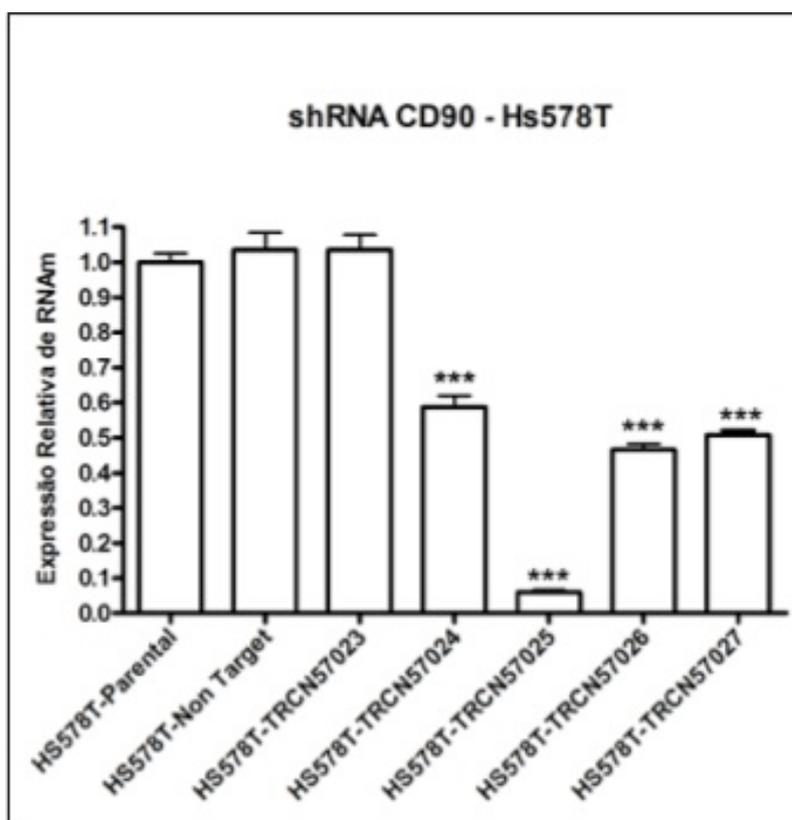
**Figure 16: Análise de Western Blot do CD90 na linhagem MCF10A parental, na transduzida com o vetor pLV-eGFP (vetor vazio) e pLV-eGFP-CD90 (CD90+).**

Os extratos protéicos das células fluorescentes previamente selecionadas por “cell sorting” foram fracionados em gel de acrilamida, transferidos para a membrana de nitrocelulose e incubados com o anticorpo anti-CD90. O *immunoblot* mostrado é um resultado representativo da expressão protéica do CD90 na linhagem MCF10A CD90+.

#### 4.3.2 Inibição do marcador CD90 na linhagem Hs578-T

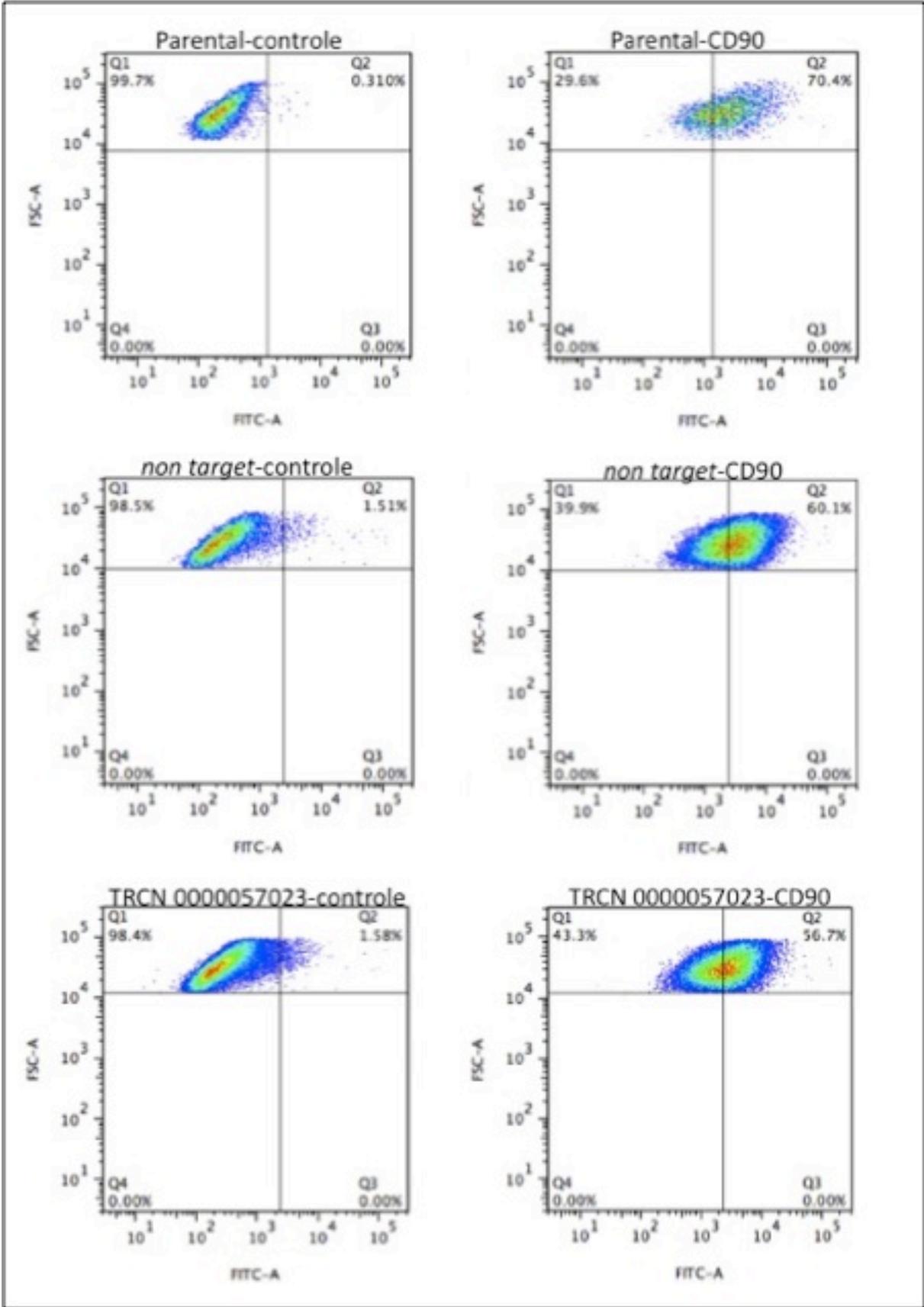
Para inibição da expressão do CD90 na linhagem tumorigênica Hs578-T, foram utilizadas cinco construções distintas do sistema *mission shRNA*. As linhagens geradas foram, então, selecionadas com 2µg/mL de puromicina. Através da técnica de qRT-PCR, foi possível observar que a construção mais eficiente para inibição da expressão do RNA mensageiro do CD90 na linhagem Hs578-T foi a TRCN

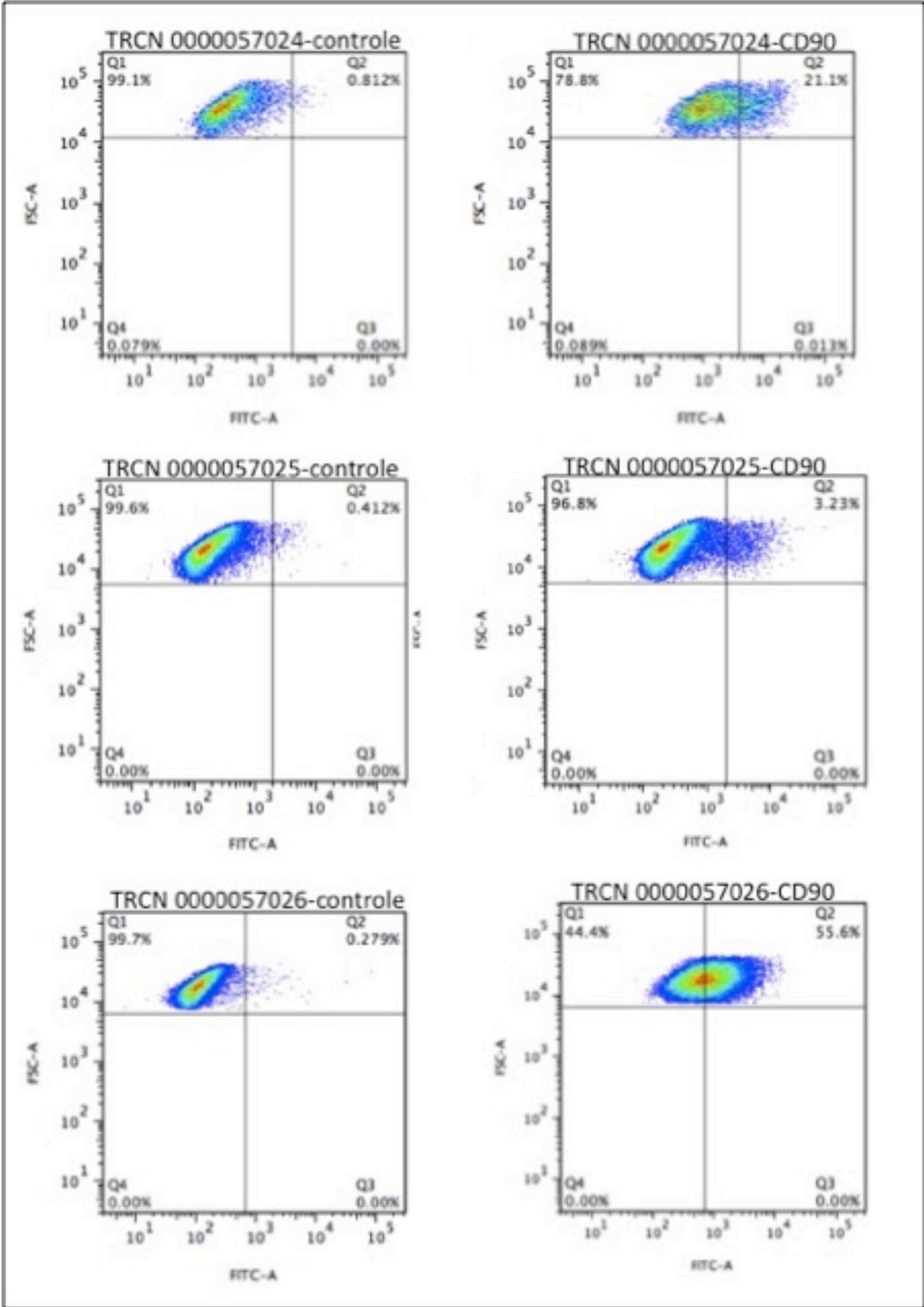
000057025 (Figura 17; Hs578T Parental vs Hs578T TRCN57025  $0.0590 \pm 0,01$ ;  $p < 0,05$ ). A expressão protéica do CD90 foi avaliada, inicialmente, por citometria de fluxo (Figura 18) e, posteriormente, a inibição da linhagem transduzida com a construção TRCN57025 foi confirmada através de Western Blot (Figura 19).

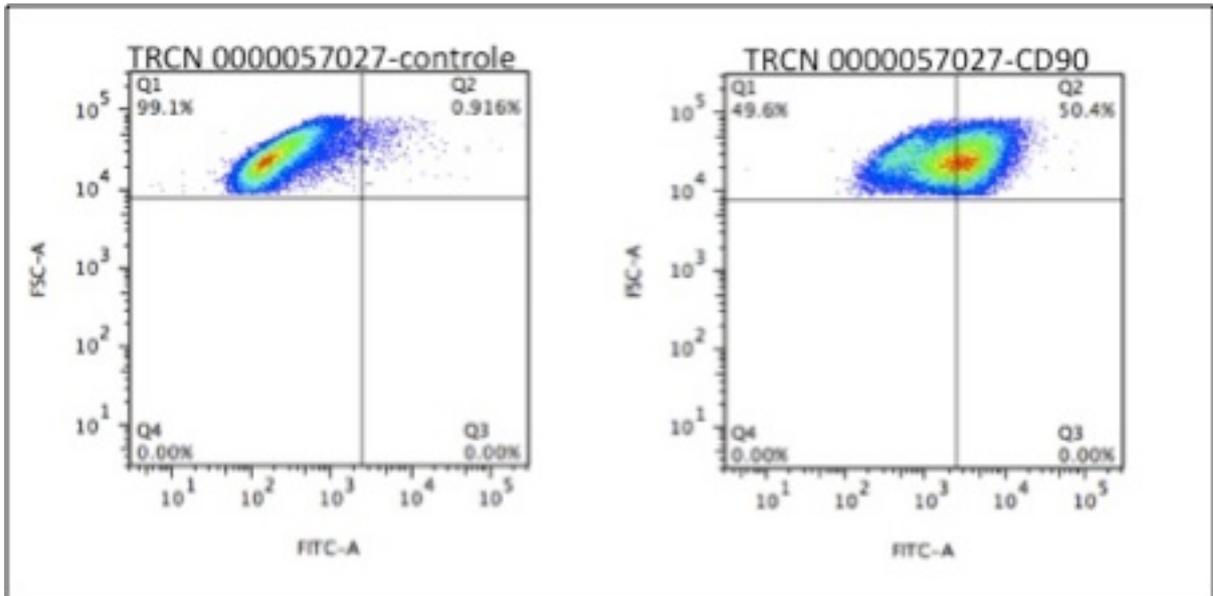


**Figure 17: Expressão do RNA mensageiro do marcador CD90 na linhagens Hs578-T transduzidas e na parental.**

Análise por qRT-PCR dos níveis de expressão relativa de mRNA de CD90 na linhagem Hs578-T parental e nas linhagens transduzidas com cinco vetores lentivirais do sistema Mission shRNA detentores de sequências adequadas para inibição do CD90. Como controle, foi utilizado o vetor shRNA non-target do mesmo sistema. A expressão é relativa à linhagem Hs578T Parental. Os genes endógenos utilizados no Genom foram *GAPDH* e *HPRT*. Os asteriscos mostram a diferença de expressão estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Experimento realizado em triplicata ( $n=3$  experimentos independentes).

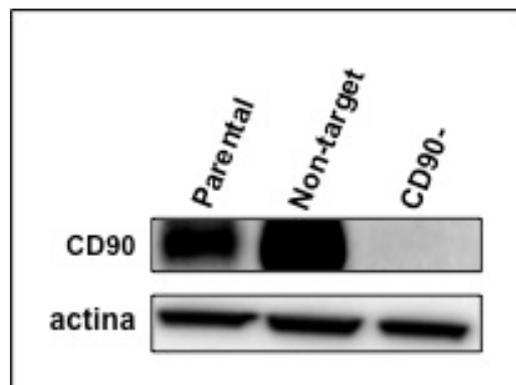






**Figure 18:** Níveis da expressão proteica do marcador CD90 na linhagens Hs578-T transduzidas e na parental.

A análise protéica foi realizada por citometria de fluxo.  $10^6$  células em suspensão de cada linhagem foram marcadas com anticorpo anti-CD90. O controle corresponde à células não marcadas com o anticorpo. Os *gates* foram desenhados no programa computacional *FlowJo* 7.6 tendo, como referência, as células não marcadas de cada linhagem. As porcentagens de células CD90 positivas e negativas estão indicadas nos quadrantes de cada gráfico.



**Figure 19:** Análise de Western Blot do CD90 na linhagem Hs578T parental, transduzida com o non-target e a construção TRCN57025 (CD90-).

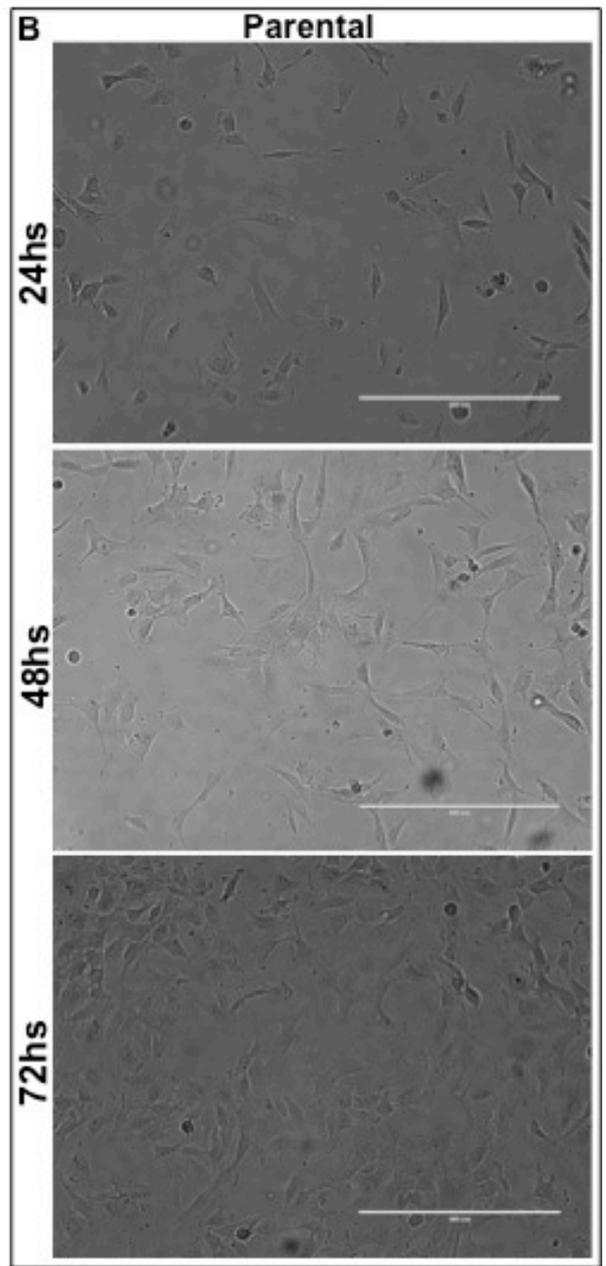
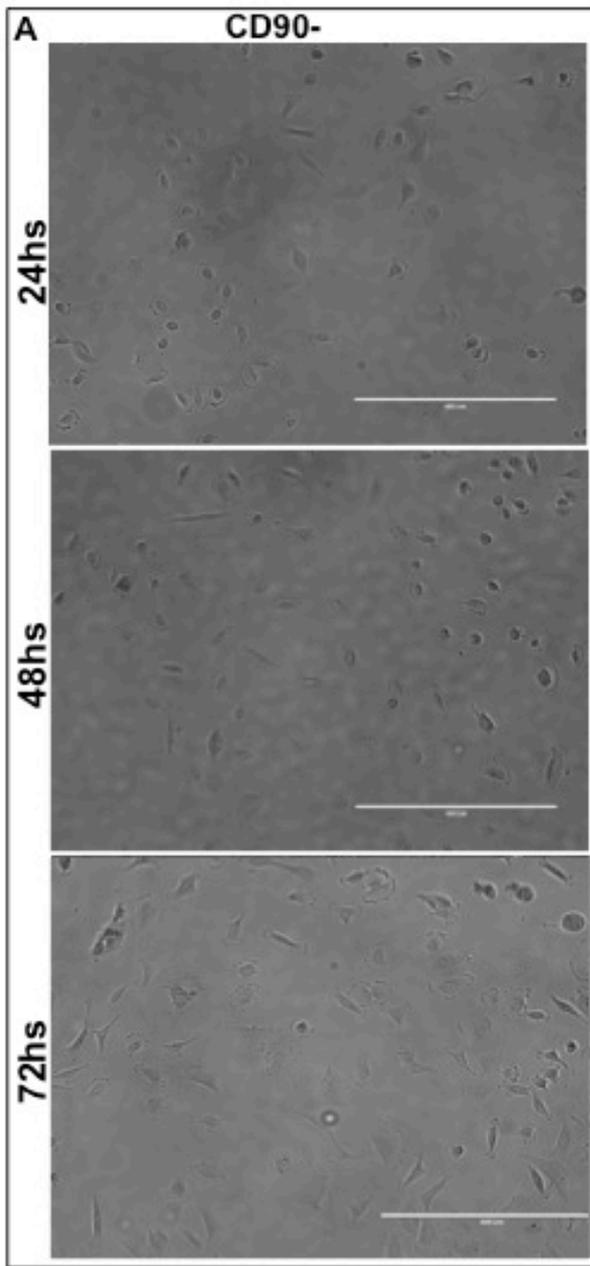
Após o resultado de qRT-PCR e citometria, a linhagem com menor expressão do CD90 foi selecionada para análise da expressão protéica por Western Blot. O *immunoblot* mostrado é um resultado representativo da inibição protéica do CD90.

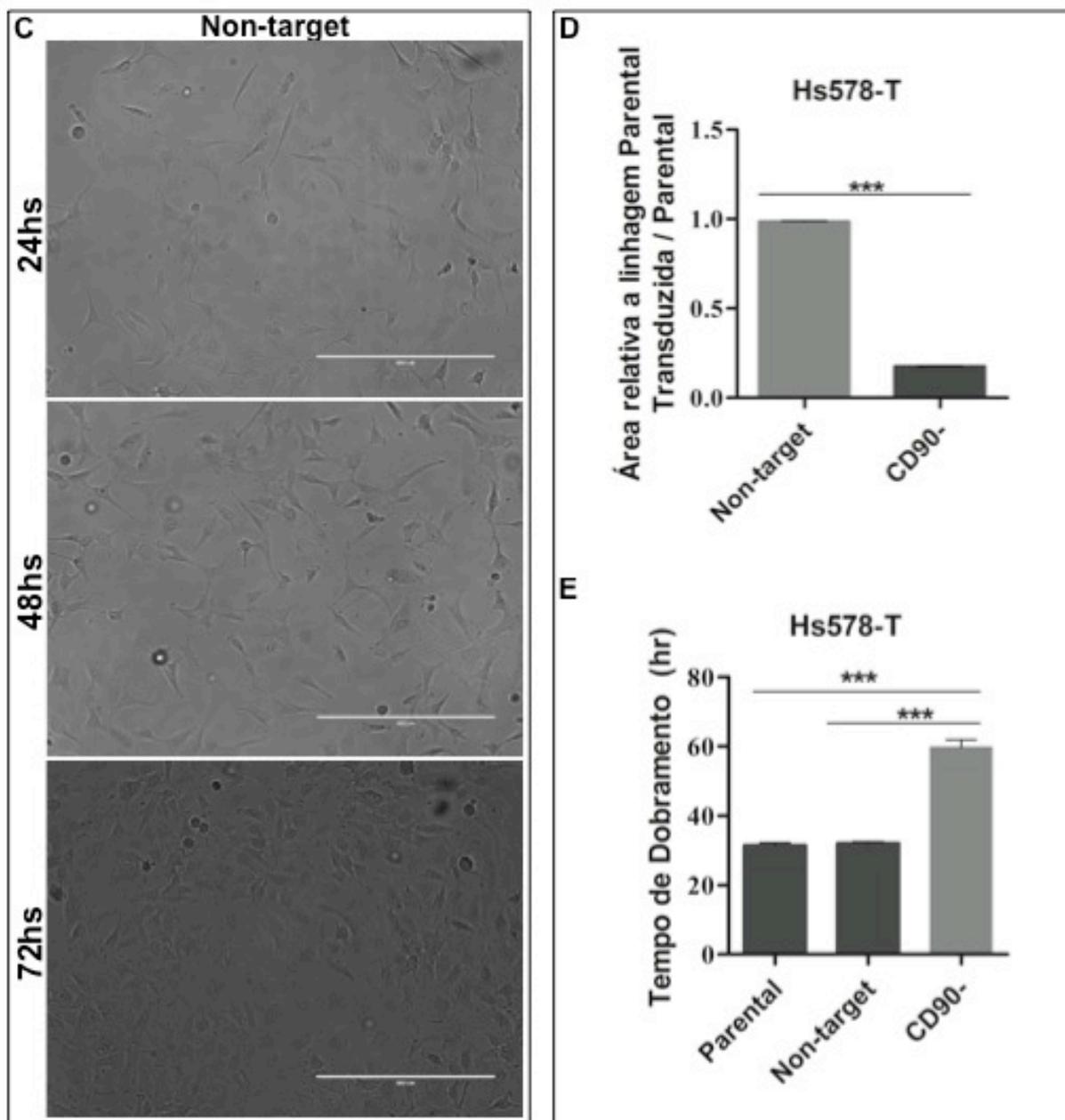
#### **4.4. Caracterização das linhagens MCF10-Cd90+ e Hs578T-CD90-**

##### **4.4.1. Morfologia e tempo de dobramento**

Após a confirmação da inibição do CD90 na linhagem Hs578T e a superexpressão na MCF10A, foram analisados, primeiramente, o aspecto morfológico e o tempo de dobramento destas células.

Foi possível notar que as células da linhagem Hs578T geneticamente modificada para o estudo do efeito da inibição do gene CD90 eram menores, mais arredondadas e apresentavam um crescimento mais lento em relação à linhagem parental e à linhagem transduzida com o vetor controle *non-target* (Figura 20A, 20B e 20C). A diferença no tamanho das células foi quantificada no programa computacional ImageJ a partir da análise das áreas das células. De acordo com essa quantificação, foi observado que o tamanho das células da linhagem Hs578-T nas quais o CD90 havia sido suprimido era aproximadamente dez vezes menor em relação às células parentais e ao controle *non-target* (figura 20D). A velocidade de crescimento das linhagens foi testada através da análise do tempo de dobramento das mesmas. A partir desta análise, foi observado que as células Hs578T-CD90- apresentaram o dobro do tempo de dobramento em relação às células parentais e às células transduzidas com vetor controle (Figura 20E), confirmando, assim, o crescimento mais lento da linhagem contendo o CD90 inativado.

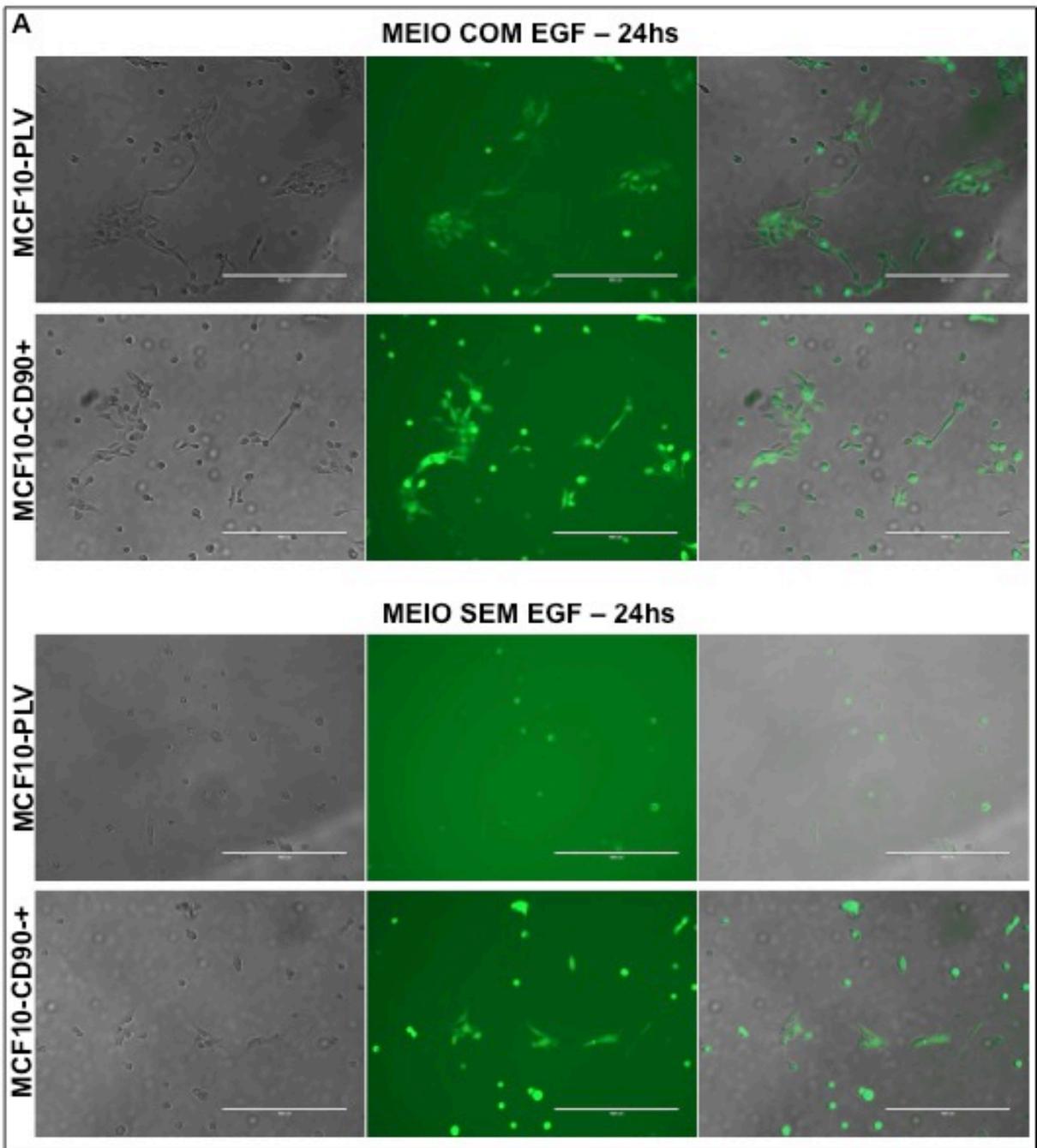


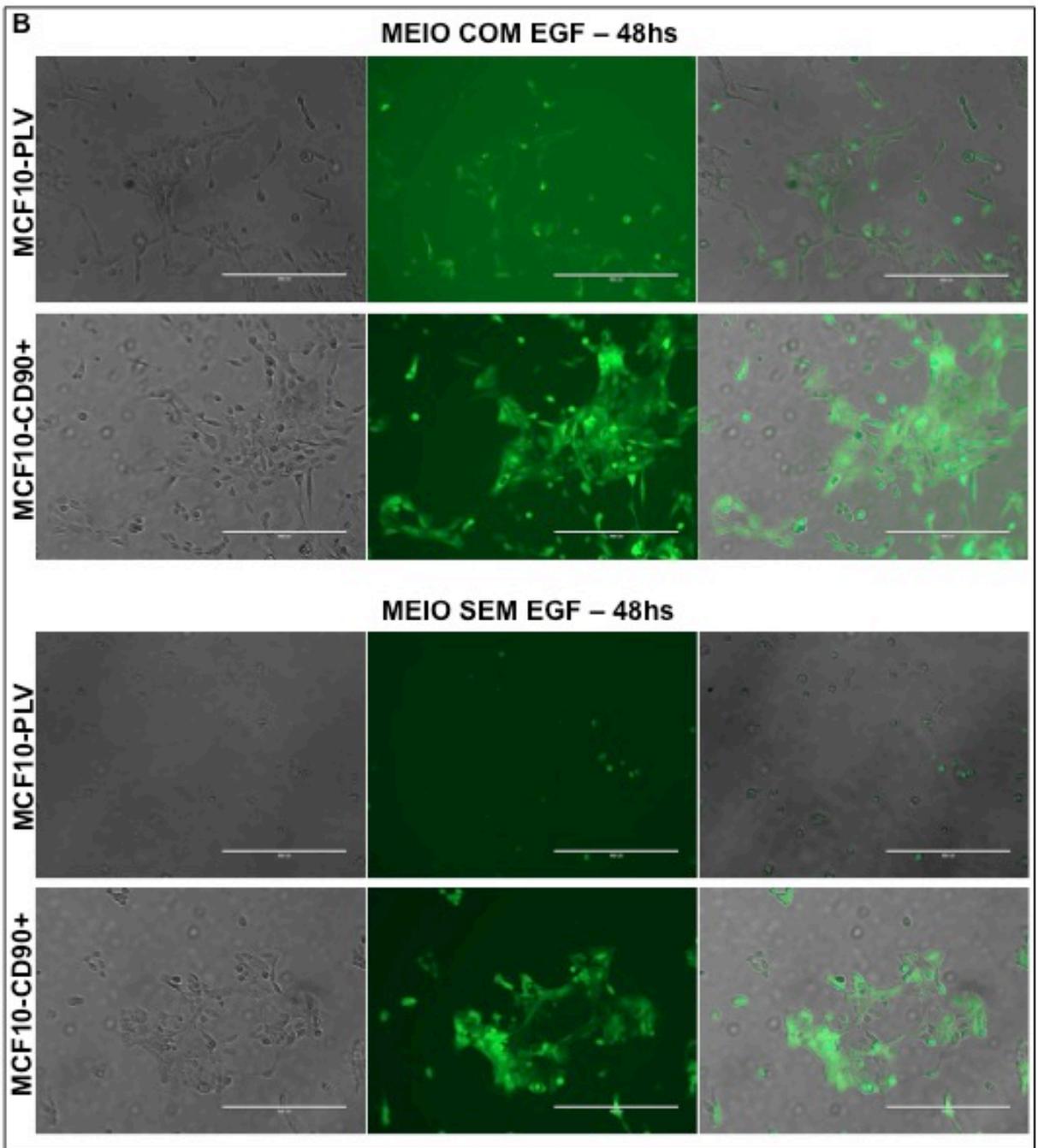


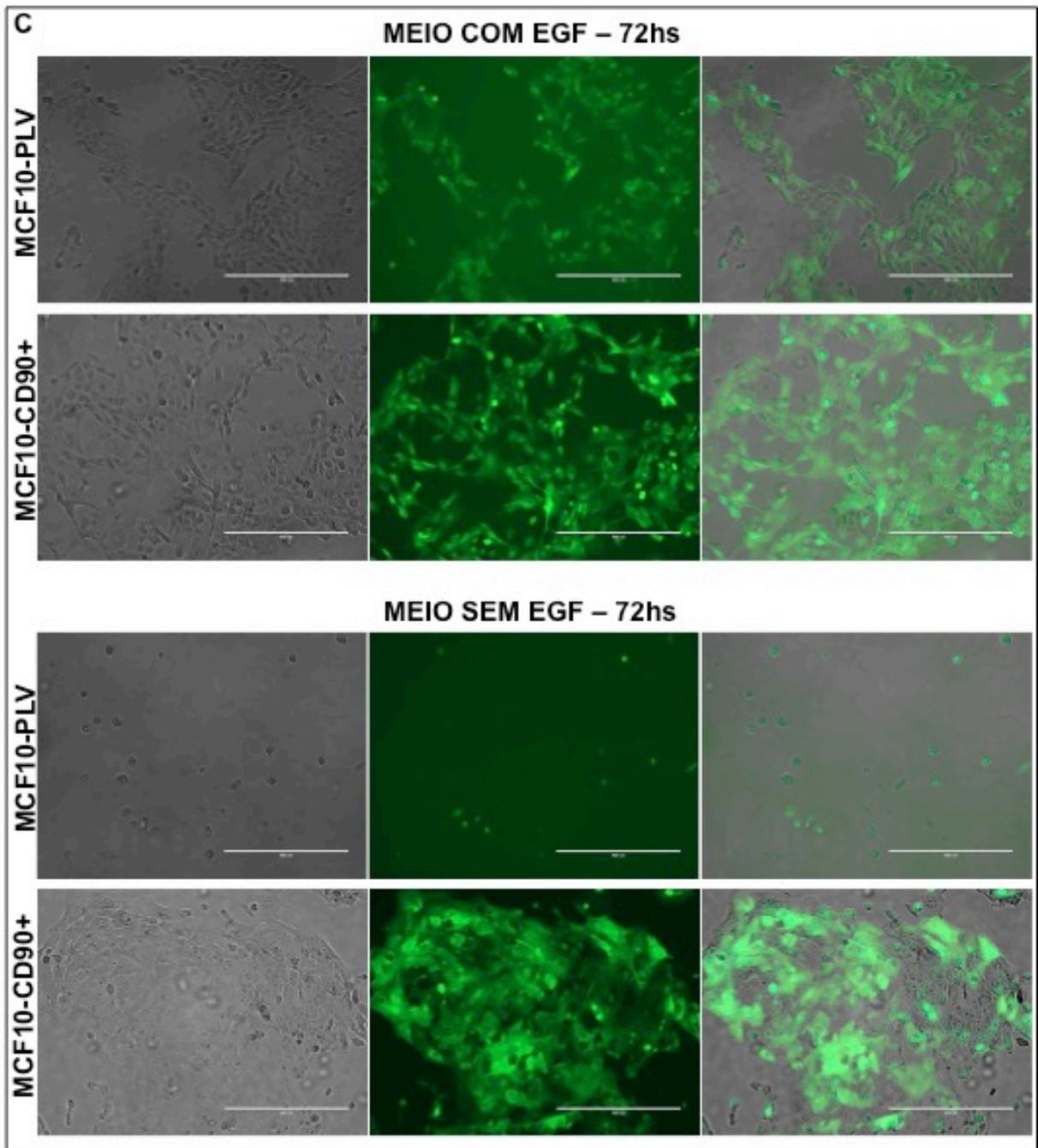
**Figure 20: Caracterização das linhagens Hs578-T transduzidas.**

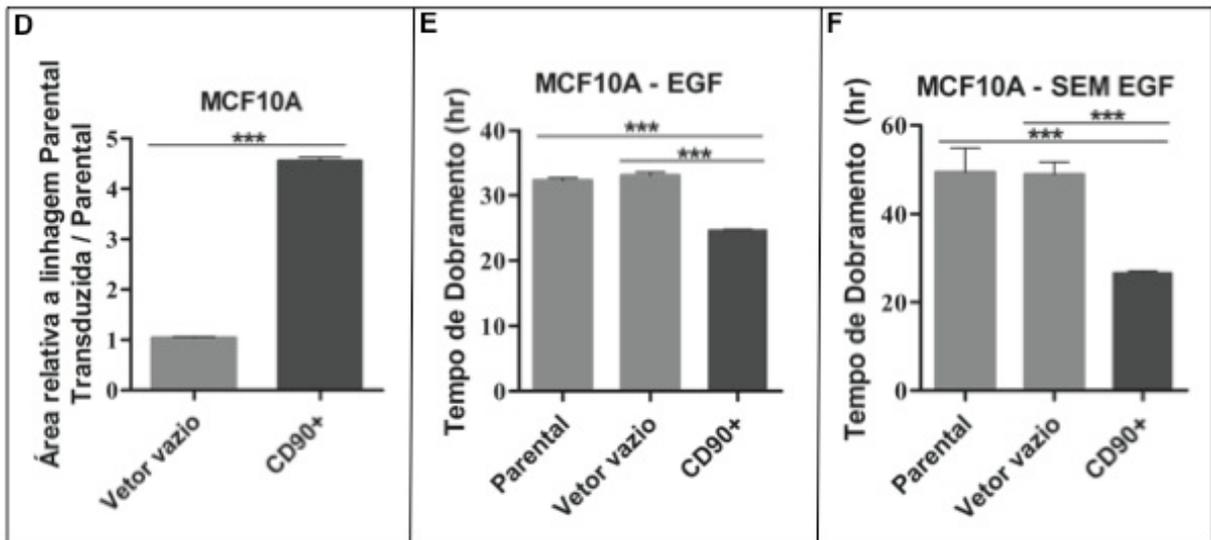
Fotomicrografias das linhagens: Hs578T-CD90<sup>-</sup> (A), Hs578T-parental (B) e Hs578T-*non-target* (C) em diferentes densidades. O plaqueamento foi realizado em baixa densidade celular e as imagens foram registradas ao microscópio EVOS FI Fluorescence imager no aumento de 100x. (D) Área celular da linhagem Hs578T-*non-target* e Hs578T-CD90<sup>-</sup> relativa à área da linhagem parental. As áreas das linhagens foram quantificadas no programa computacional ImageJ. (E) Tempo de dobramento baseado na proliferação celular. Cerca de  $5 \times 10^3$  células foram cultivadas em placas de 96 poços por 72h. O número de células foi determinado utilizando-se o Kit *CyQuant Cell Proliferation Assay*. Os asteriscos mostram a diferença de expressão estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Experimento realizado em triplicatas (n=3 experimentos independentes em quadruplicatas).

Embora a linhagem MCF10A expressando o CD90 tenha apresentado uma diferença morfológica mais sutil em relação à linhagem controle MCF10-pLV, houve uma notória diferença quanto ao crescimento celular, principalmente na ausência do fator de crescimento epitelial (EGF). Através dos registros de imagens mostrados nas figuras 21A, 21B e 21C é possível observar que as células da linhagem MCF10-CD90+ eram um pouco maiores e alongadas e apresentaram uma velocidade de crescimento maior em relação à linhagem controle tanto na presença quanto na ausência do EGF. Quando quantificado o tamanho, notou-se que a linhagem MCF10A-CD90+ era aproximadamente cinco vezes maior em relação à linhagem parental e à linhagem controle (Figura 21D). A análise do tempo de dobramento dessas linhagens também foi realizado na presença e na ausência de EGF no meio de cultura, conforme mostrado nas figuras 21E e 21F, respectivamente. A partir desta análise, foi constatado que as células MCF10A-CD90+, independentemente de EGF, levaram aproximadamente 20h para dobrarem o número de células. Já as linhagens parental e controle apresentaram maior tempo de dobramento na presença de EGF em relação à célula MCF10A-CD90+ e esse tempo aumentou, chegando a 50h, na ausência do EGF.









**Figure 21: Caracterização das linhagens MCF10A transduzidas.**

As linhagens MCF10A-CD90+ e MCF10A-pLV foram cultivadas na presença e na ausência de EGF. Fotomicrografias foram registradas após 24h (A), 48h (B) e 72h (C) do plaqueamento para registro da diferença da densidade celular e morfologia. O plaqueamento foi realizado em baixa densidade celular e as imagens foram registradas no microscópio EVOS FI Fluorescence imager sob aumento de 100x. (D) Área celular da linhagem MCF10A-pLV e MCF10A-CD90+ relativa a área da linhagem parental. As áreas das linhagens foram quantificadas no programa computacional ImageJ. Tempo de dobramento baseado na proliferação celular das células cultivadas na presença de EGF (E) e na ausência de EGF (F). Cerca de  $5 \times 10^3$  células foram cultivadas em placas de 96 poços por 72h. O número de células foi determinado utilizando-se o Kit *CyQuant Cell Proliferation Assay*. Os asteriscos mostram a diferença de expressão estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Experimento realizado em triplicatas (n=3 experimentos independentes quadruplicatas).

#### 4.4.2. Análise da via de sinalização de EGF

A partir dos resultados anteriores, foi observado que a linhagem MCF10-A expressando CD90 era capaz de crescer independentemente do fator de crescimento epidérmico (EGF). Para investigar a possível relação entre o CD90 e a ativação da via de sinalização de EGF, inicialmente, foram avaliados, por *Western Blotting*, a expressão proteica e a respectiva fosforilação de fatores cruciais presentes nesta via. Devido à necessidade do EGF no meio de cultura para o crescimento da linhagem MCF10-A parental, as células desta linhagem e daquela

transformada com o vetor vazio foram carenciadas por somente 48h antes da extração proteica. Já a linhagem MCF10A-CD90+ foi cultivada na ausência de EGF. Como controle positivo, foi feita a análise de todas as linhagens cultivadas na presença de meio contendo EGF (dados não mostrados). Através dessa análise de Western blotting, foi possível observar que houve uma alteração significativa dos níveis de fosforilação do receptor de EGF e de alguns fatores (Erk(1/2), c-Jun e Jnk) tanto na linhagem MCF10A-CD90+ como na linhagem Hs578T-CD90-.

Como mostrado na figura 22A, na ausência de EGF, o nível de expressão da forma fosforilada do seu receptor apresentou-se significativamente aumentado na linhagem MCF10A-CD90<sup>+</sup>, e drasticamente reduzido na linhagem parental e naquela transformada com vetor vazio (pLV-eFGP). Foi observado também uma diferença de expressão significativa na linhagem Hs578T. Conforme apresentado na mesma figura, observa-se uma redução dos níveis de fosforilação do receptor de EGF na linhagem Hs578T-CD90- e níveis um pouco mais elevados na linhagem parental e naquela transformada com o vetor *non-target*. O mesmo padrão foi observado na análise das proteínas Erk(1/2) (Figura B), c-Jun (Figura C) e Jnk (figura D), cujos níveis de fosforilação foram mais elevados nas linhagens que expressam o CD90 (MCF10-CD90+, Hs578T-parental e Hs578T-non-target) e reduzidos nas linhagens que não expressam o CD90 (MCF10-A-parental, MCF10A-vetor vazio e Hs578T-CD90-). Além desses fatores, também foi analisada a fosforilação do c-Jun, entretanto, não se encontrou diferença de expressão nas linhagens investigadas (dados não mostrados).

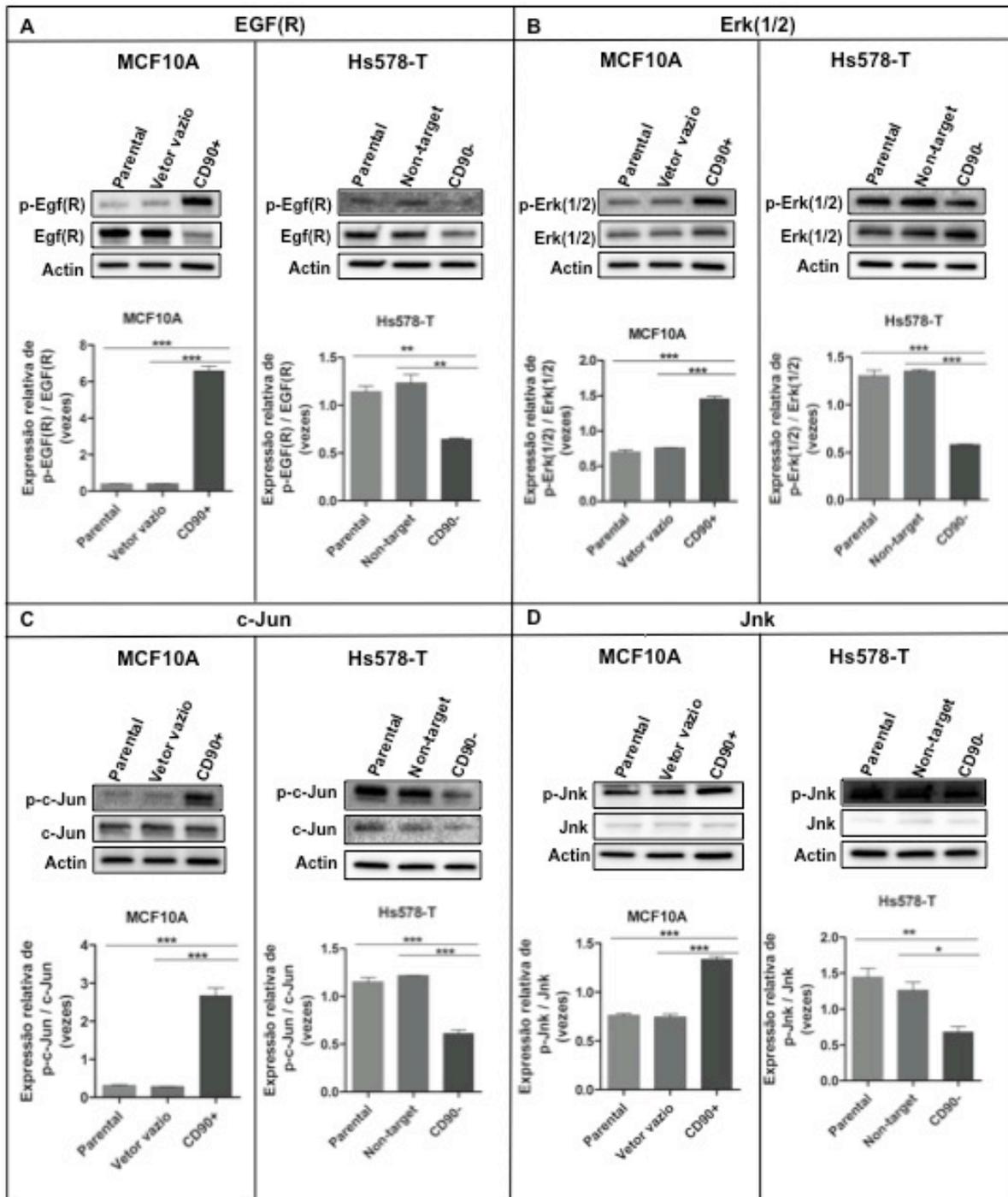
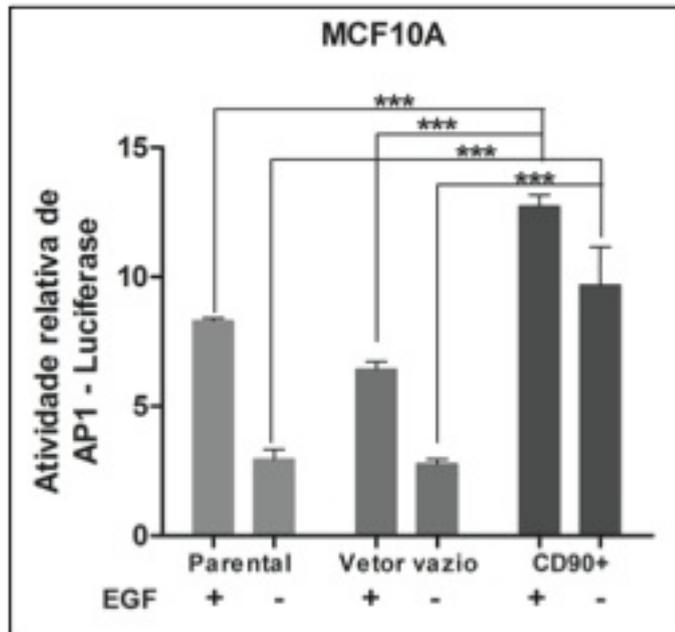


Figure 22: Análise da expressão proteica de componentes da via de sinalização de sinalização EGF.

Análise por Western Blotting do receptor de EGF **(A)**, Erk(1/2) **(B)**, c-Jun **(C)** e Jnk **(D)** nas linhagens MCF10A-Parental, MCF10A-pLV (vetor vazio), MCF10A-CD90+, Hs578T-Parental, Hs578T-*non-target* e Hs578T-CD90-. Os immunoblots mostrados são resultados representativos. Os resultados de densitometria são médias Média±EPM; Os asteriscos mostram a diferença de expressão estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Experimento realizado em triplicatas (n=3 experimentos independentes em triplicatas).

A partir da análise dos resultados obtidos por Western Blot, verificou-se que a linhagem MCF10A expressando CD90, mesmo na ausência de fator de crescimento epidérmico, apresentou proteínas fosforiladas essenciais para ativação da via de sinalização de EGF. Sabendo-se que essa via resulta na ativação do fator transcricional AP-1 (*activating protein-1*), foi testado, então, se a linhagem MCF10A-CD90+, na ausência de EGF, era também capaz de ativar o fator AP-1. Para isso, foi realizado ensaio de gene repórter utilizando um vetor contendo o elemento responsivo do fator de transcrição AP-1, o qual leva a transcrição do gene da luciferase. A atividade desta enzima foi normalizada através da expressão constitutiva da *Renilla luciferase*, cujo cDNA foi co-transfectado com o gene repórter. Análise dos resultados mostrou que a atividade de AP1-luciferase na linhagem MCF10A-CD90+ não tratada com EGF foi significativamente maior, cerca de três vezes, em relação às linhagens parental e controle (Figura 23). Além disso, é importante ressaltar que, mesmo na presença de EGF, a atividade da luciferase também foi maior nas células que superexpressão CD90, mostrando que esta molécula foi capaz não só de ativar o fator AP-1 independentemente de EGF, como, também, de aumentar a atividade de AP-1 na presença do EGF.



**Figure 23: Análise da atividade do elemento responsivo do fator de transcrição AP-1.**

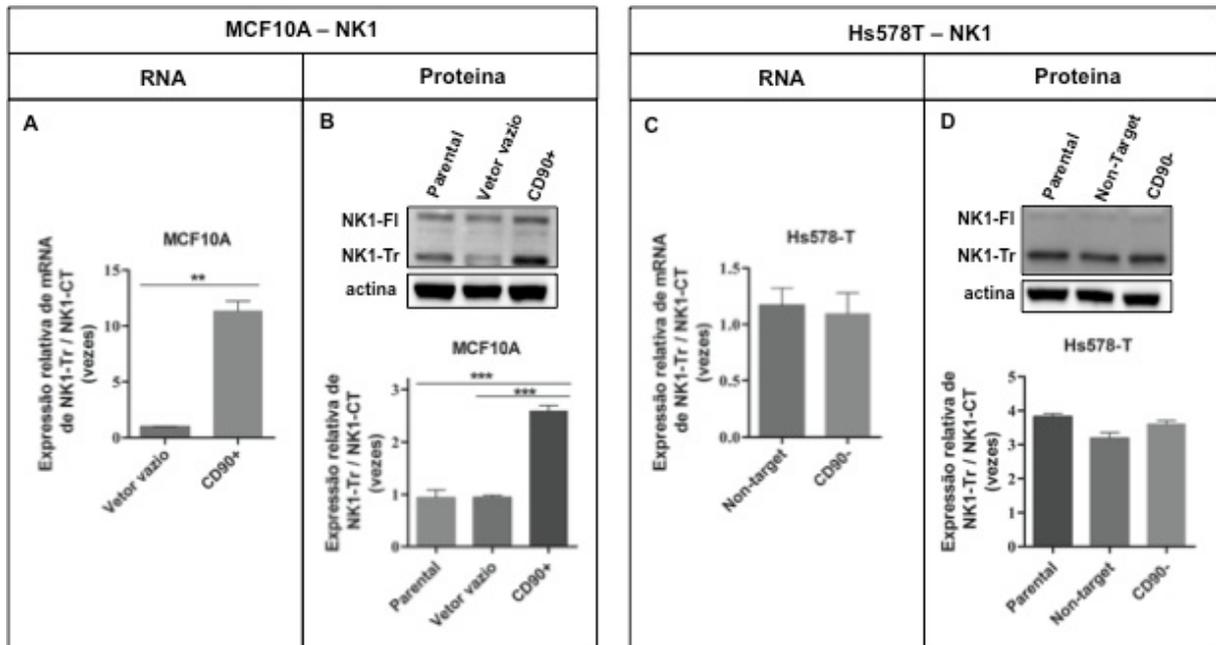
$2 \times 10^5$  células das linhagens MCF10A-Parental, MCF10A-pLV e MCF10A-CD90+ foram plaqueadas, transfectadas com vetor pGL4.44 e pRL-TK, carenciadas para SFB e EGF ou tratadas com EGF. A leitura da atividade da luciferase foi feita após 48h da transfecção no comprimento de onda entre 560/480nm. A atividade da luciferase foi normalizada através a atividade/expressão constitutiva da Renilla. Os asteriscos mostram a diferença de expressão estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). O experimento foi realizado em triplicatas (n=3 experimentos independentes em triplicatas).

Assim, em conjunto, os resultados mostraram que células não tumorigênicas de mama expressando o CD90 foram capazes de ativar a via de sinalização de EGF independente da presença deste fator no meio de cultura.

#### 4.4.3. Análise de marcadores tumorais

Para caracterização do potencial tumorigênico do CD90 nas linhagens transformadas, foram selecionadas proteínas que estão relacionadas com a transformação maligna do câncer de mama para serem analisadas.

Como marcador de malignidade, investigou-se a expressão das duas isoformas, (molécula completa e a truncada), do receptor Neuroquinina 1 (NK1). A escolha desta proteína foi baseada em estudos que mostraram que a forma truncada do NK1 exerce funções oncogênicas, encontrando-se mais expressa no carcinoma mamário. Baseado nestes estudos, foi analisado tanto a expressão do RNA mensageiro como da proteína das duas isoformas deste receptor. Os resultados do RT-PCR quantitativo mostraram que a relação entre a forma truncada e a forma completa do receptor NK1 foi significativamente mais elevado na linhagem MCF10-CD90+ chegando a ser 12 vezes maior em relação à linhagem parental (Figura 24A) . Este resultado foi confirmado por Western Blot, no qual foi observado uma maior expressão da forma truncada da proteína na linhagem MCF10A-CD90+. Por outro lado, a inibição do CD90 na linhagem Hs578T não causou alteração significativa alguma na expressão do receptor NK1 na respectiva linhagem parental e naquela transformada com o vetor *non-target* (Figura 24C; Figura 24D).



**Figure 24: Análise da expressão das isoformas completa e truncada do receptor NK1.**

As linhagens celulares foram cultivadas conforme descrito em Material e Métodos. Após atingirem 80% de confluência, o RNA e as proteínas totais foram extraídos. A expressão do NK1 foi analisada por qRT-PCR (mRNA) e Western Blot (proteica). **(A)** resultado da análise por qRT-PCR e **(B)** resultado da análise do Western das linhagens MCF10A-Parental, MCF10A-vetor vazio e MCF10A-CD90+. **(C)** resultado da análise do qRT-PCR e **(D)** resultado da análise do Western das linhagens Hs578T-Parental, Hs578T-non-target e Hs578T-CD90-. A expressão do mRNA é relativa às linhagens parentais (MCF10A e Hs578T). Os genes endógenos utilizados para a normalização foram: *GAPDH* e *HPRT*. Os resultados de densitometria são médias Média±EPM; Os asteriscos mostram a diferença de expressão estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Experimentos realizados em triplicatas ( $n=3$  experimentos independentes em triplicatas).

Além de investigar o NK1, foi analisado também a expressão proteica de marcadores do processo da transição epitélio-mesenquimal. Esta análise foi baseada no fato do CD90 ser um marcador clássico de células-tronco mesenquimais e a transição ser caracterizada pela mudança do fenótipo epitelial para mesenquimal. Basicamente, esta mudança se dá através da perda, ou expressão reduzida, de marcadores de células epiteliais, como: E-caderina e claudina, e o aumento da expressão de marcadores mesenquimais, como a N-caderina e vimentina. Quando os marcadores mesenquimais foram analisados nas linhagens MCF10A-Parental,

MCF10A-vetor vazio e MCF10-CD90+, foi possível observar que os marcadores mesenquimais vimentina e N-caderina, estavam mais expressos nas linhagens MCF10A-CD90+ (figura 25A; Figura 25B). Já nas linhagens Hs578T-Parental, Hs578-T *non-target* e Hs578T-CD90- a expressão desses marcadores estava reduzida na linhagem Hs568T-CD90- (Figura 25D; Figura 25E). Não houve alteração significativa do marcador epitelial E-caderina nas linhagens analisadas (figura 25C; Figura 25F), devendo ser investigada a localização deste marcador por imunohistoquímica.

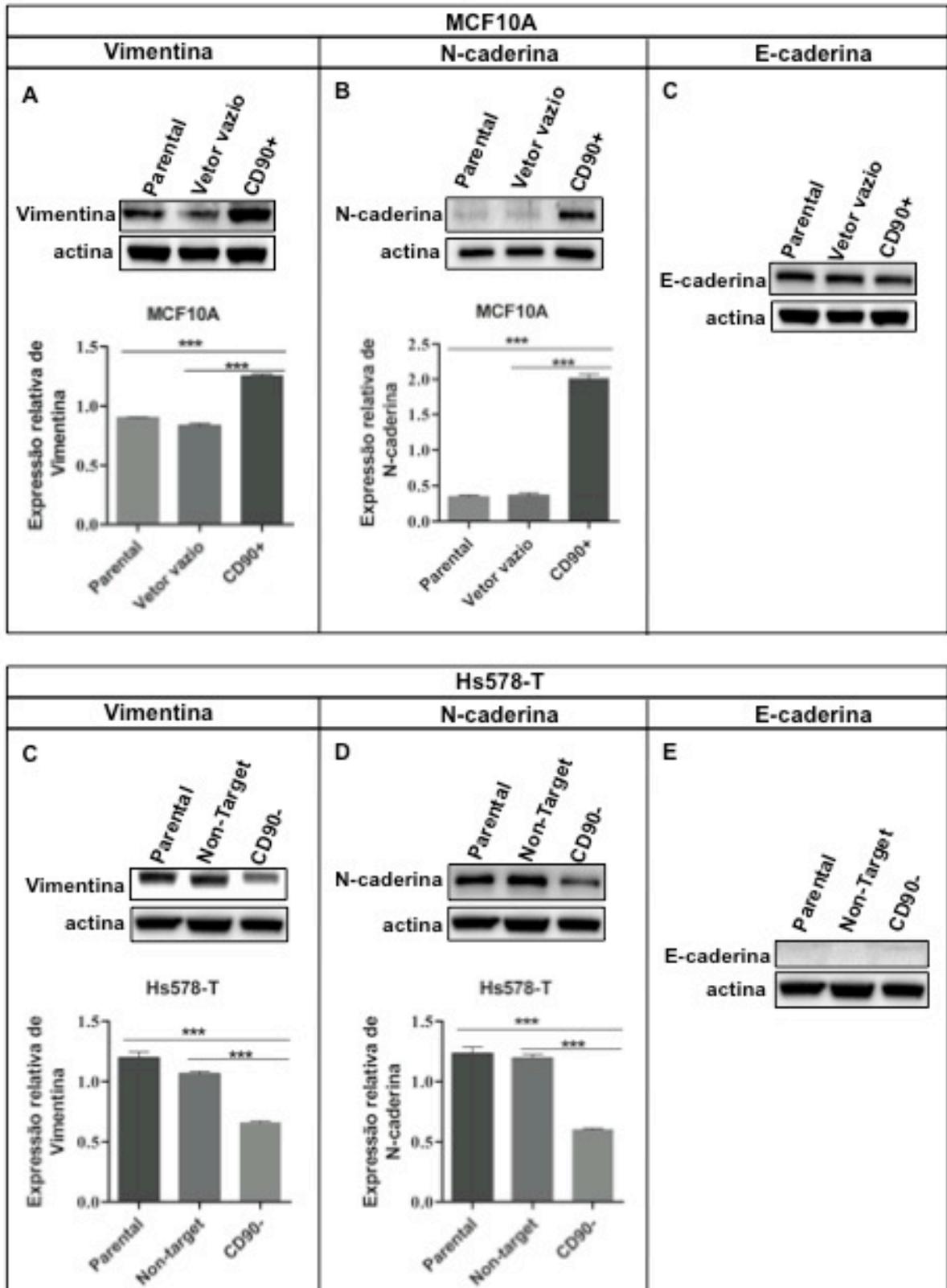


Figure 25: Análise da expressão proteica dos marcadores da transição epitélio-mesenquimal.

Análise de Western Blotting da expressão de Vimentina **(A)**, N-caderina **(B)**, E-caderina **(C)** nas linhagens MCF10A-Parental, MCF10A-pLV (vetor vazio), MCF10A-CD90+. Vimentina **(C)**, N-caderina **(D)**, E-caderina **(E)** e Hs578T-Parental, Hs578T-non-target e Hs578T-CD90-. Os immunoblots mostrados são resultados representativos. Os resultados de densitometria são médias Média±EPM; Os asteriscos mostram a diferença de expressão estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Experimento realizado em triplicatas ( $n=3$  experimentos independentes em triplicatas).

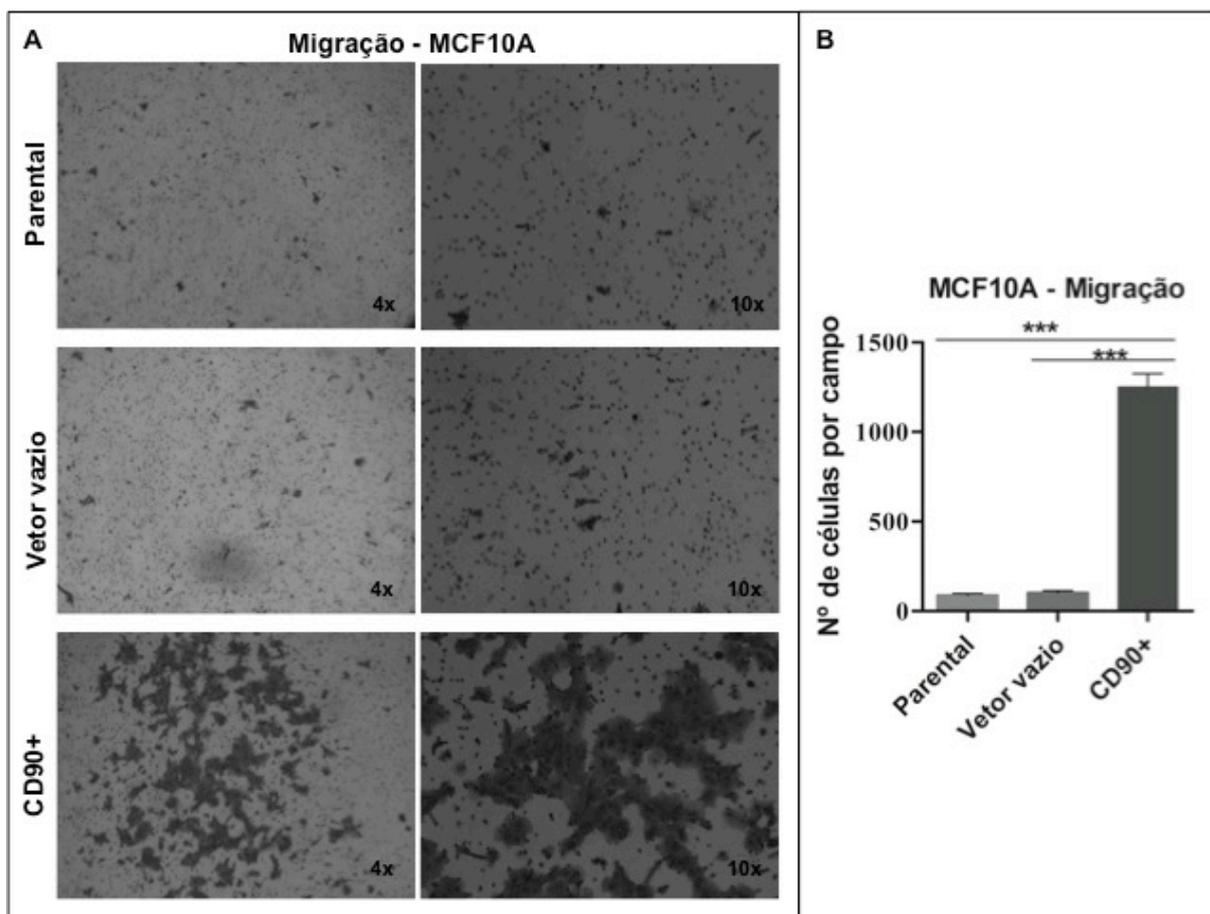
#### **4.4.4. Análise *in vitro* do potencial invasivo das linhagens celulares**

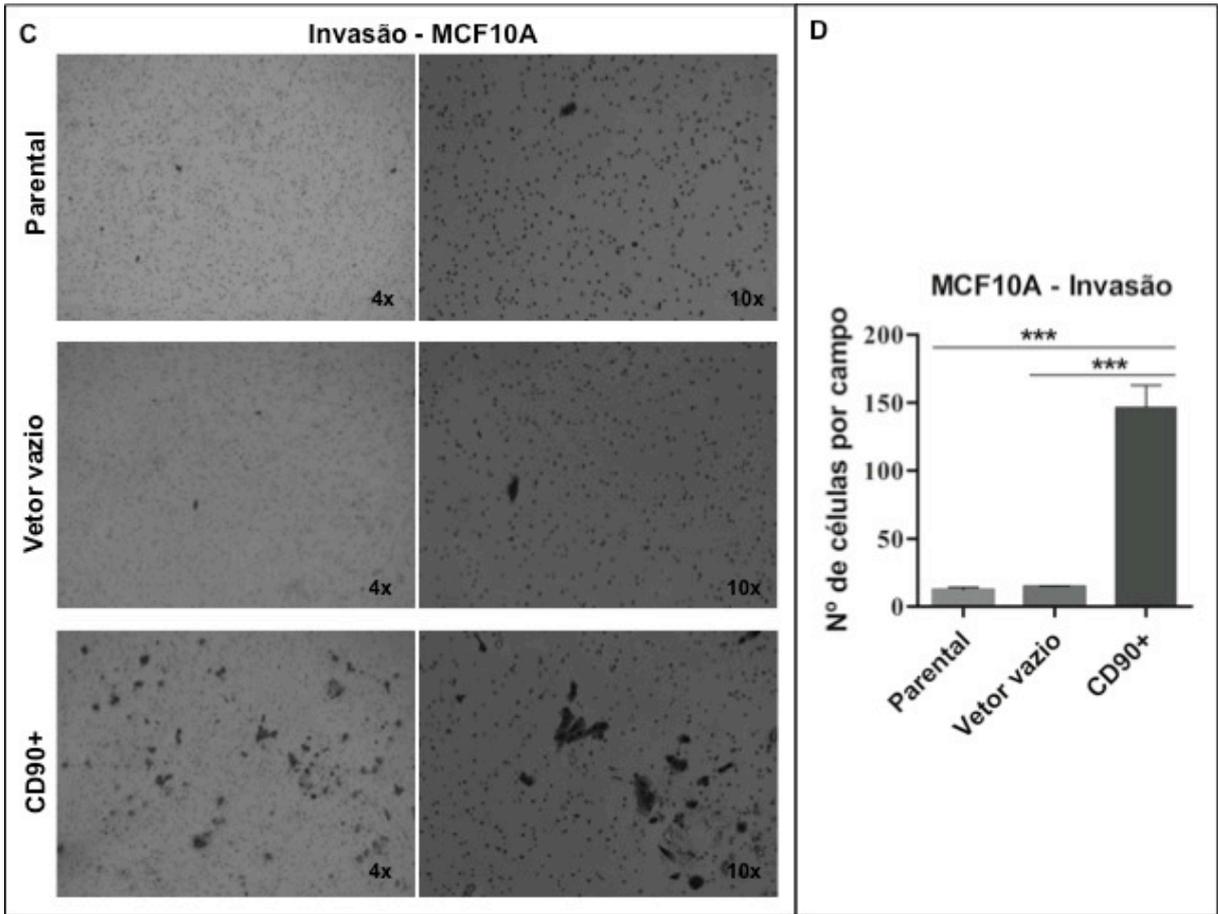
Com intuito de caracterizar o potencial invasivo das linhagens transformadas com o CD90, foram realizados ensaios de quimioinvasão celular *in vitro*. Os ensaios foram realizados em placas do tipo Transwell®, utilizando-se membrana basal reconstruível (Matrigel™) como substrato para invasão e soro (SFB) como agente quimioatrativo. As células, previamente carenciadas para soro, foram plaqueadas sobre as membranas de policarbonato porosas das placas Transwell®, as quais estavam revestidas, ou não, com Matrigel™ para determinar o grau de invasão e o grau de migração celular.

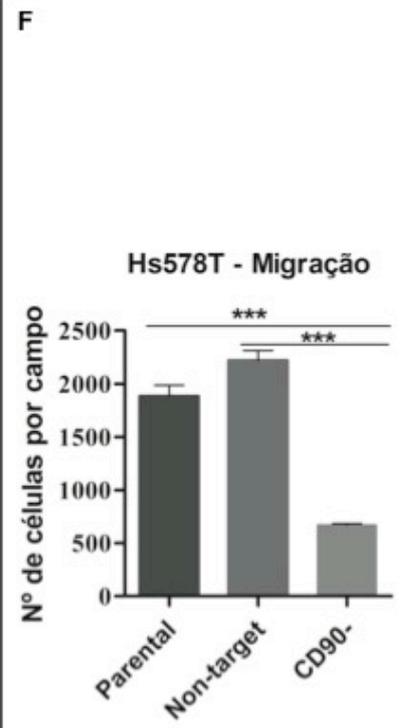
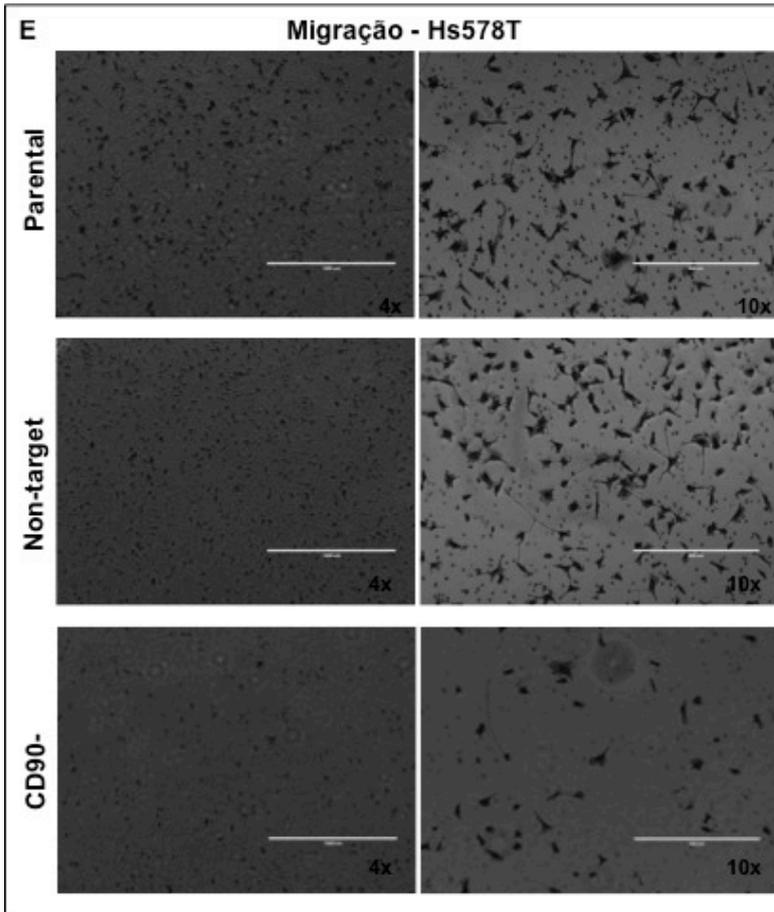
A partir destes ensaio, observou-se que dentre as linhagens MCF10A, somente aquele expressando o CD90 foi capaz de migrar (Figura A) em direção ao agente quimioatrativo. Além disso, somente células desta linhagem foram capazes de degradar os elementos da matriz extracelular, presente na membrana basal reconstruível, e invadir atingindo o compartimento inferior da câmara (Figura B). Já para as outras linhagens, MCF10A-parental e MCF10A-vetor vazio, observou-se apenas um número não significativo de células na porção inferior da câmara.

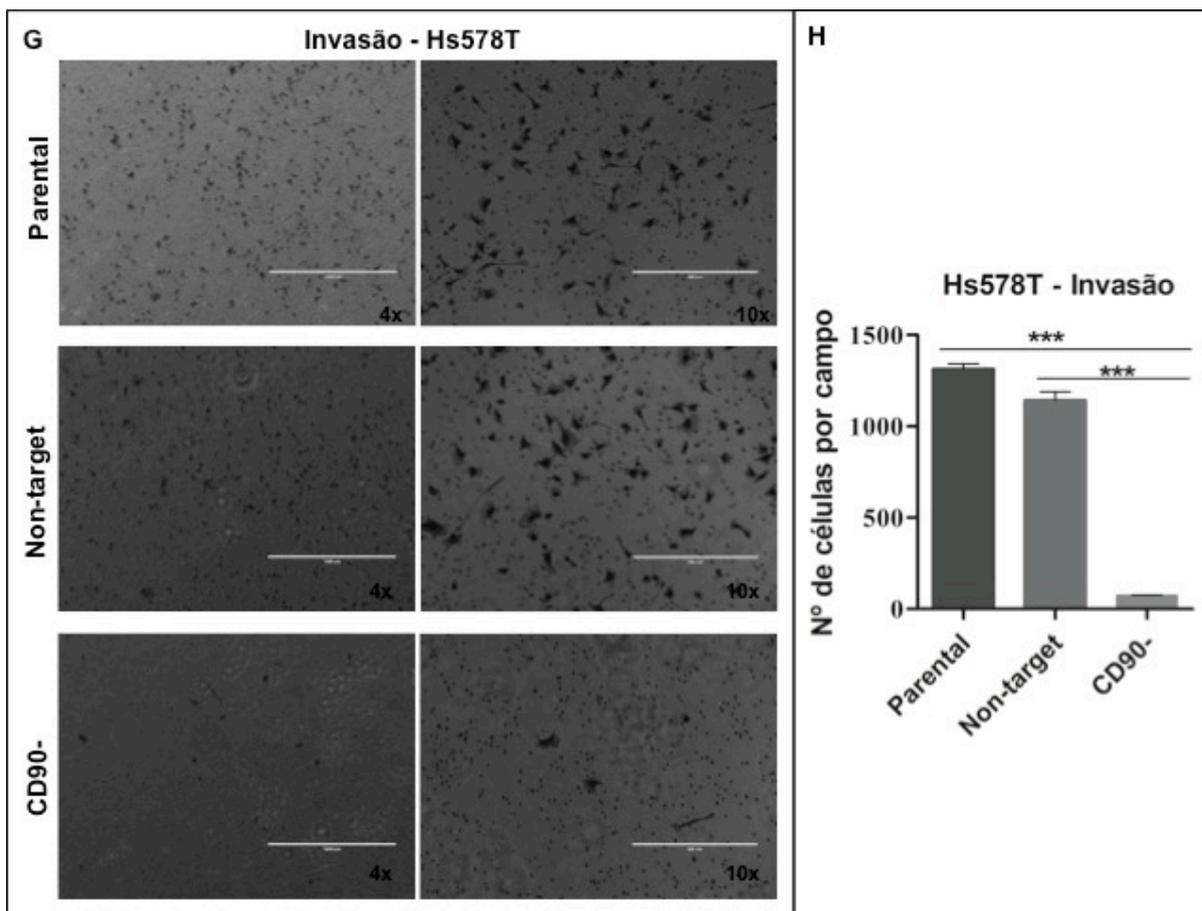
Os ensaios realizados com as linhagens Hs578T-Parental, Hs578T-*non target* e Hs578T-CD90- mostraram que houve uma diminuição significativa do número de células da linhagem Hs578-T com o CD90 silenciado que foram capazes de migrar

para o lado inferior da câmara (Figura C). Também foi observado que células desta mesma linhagem, Hs578T-CD90-, apresentaram uma baixa capacidade de invasão através dos poros obstruídos com a membrana basal de Matrigel™ (Figura D). Como esperado, a linhagem parental e aquela que recebeu o non-target foram capazes tanto de migrar de como invadir a placa revestida em direção ao agente quimioatrativo.









**Figure 26: Ensaio de migração e invasão celular em Transwell® utilizando membrana basal reconstituível (Matrigel™).**

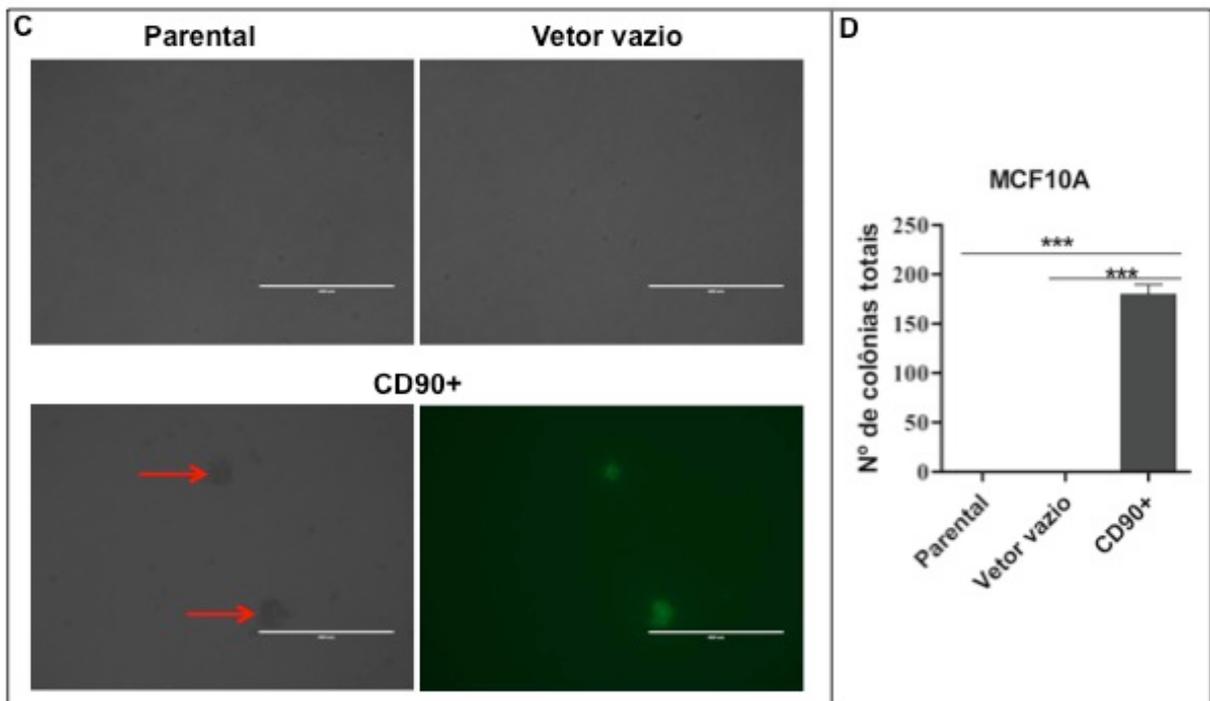
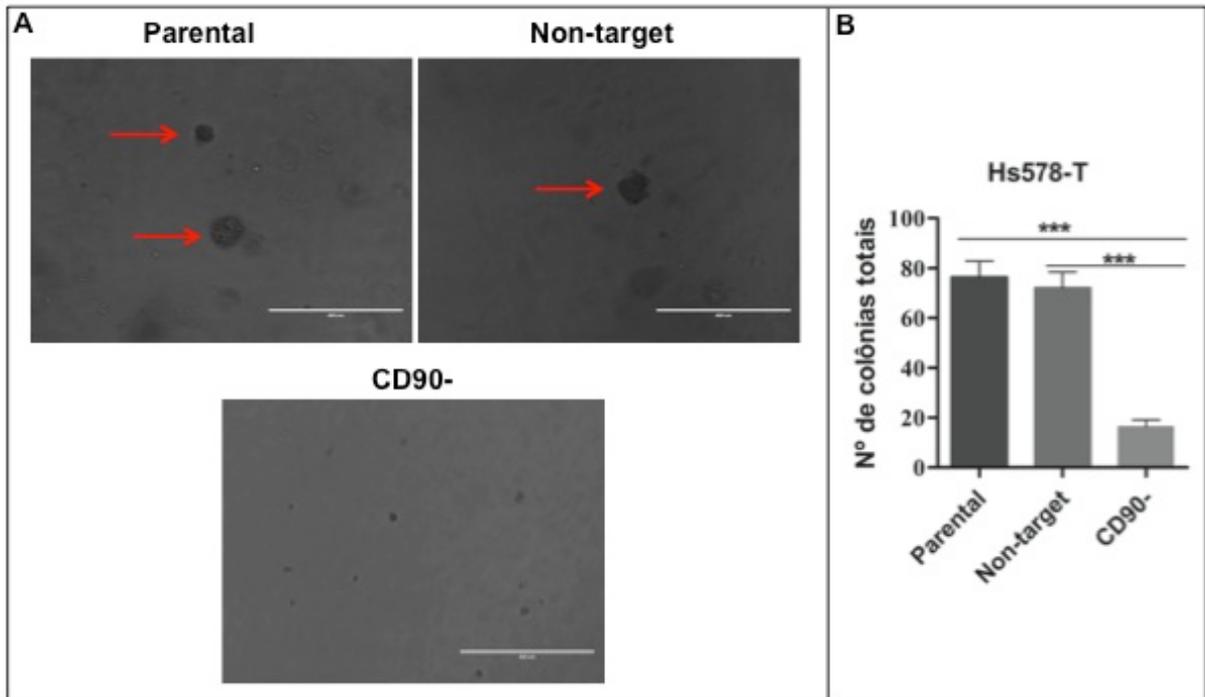
As células ( $10^5$ /poço) carenciadas para soro das linhagens parentais e transformadas foram plaqueadas sobre as câmaras revestidas, ou não, com a membrana basal. No compartimento inferior, foram adicionados meios de cultura específicos contendo alta concentração de soro, o qual atuou como quimioatrativo. Após 48 horas as células foram fixadas e coradas. As fotomicrografias foram registradas no microscópio EVOS Fl Fluorescence Imager no aumento de 100x. **(A)** Migração das linhagens MCF10A-Parental, MCF10A-vetor vazio e MCF10A-CD90+, **(B)** contagem de células que migraram para o lado inferior do inserto, **(C)** Invasão das linhagens MCF10A-Parental, MCF10A-vetor vazio e MCF10A-CD90+, **(D)** número de células que invadiram a membrana basal. **(E)** Migração das linhagens Hs578T-Parental, Hs578T-non-target e Hs578T-CD90-, **(F)** número de células que migraram através dos poros, **(G)** invasão das linhagens Hs578T-Parental, Hs578T-non-target e Hs578T-CD90- e **(H)** número de células que invadiram a membrana basal. A barra de erros representa o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas. Os asteriscos mostram as diferenças de expressão estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

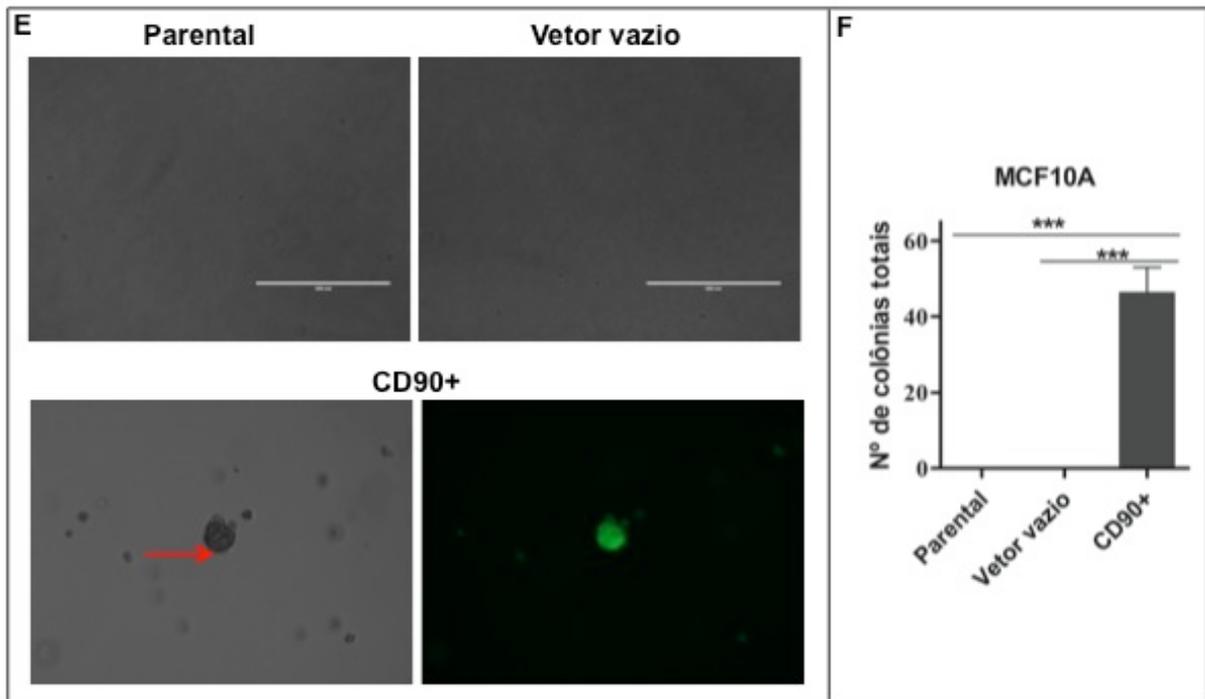
#### **4.4.5. Análise *in vitro* do potencial metastático das linhagens celulares**

Para investigar o potencial metastático das linhagens transformadas com o CD90, foram realizados ensaios *in vitro* de formação de colônia em meio semi-sólido. Foram realizados três experimentos independentes, em triplicatas, com as linhagens parentais, controles e transformadas. Além disso, devido a importância do EGF nos resultados anteriores, os ensaios com as linhagens MCF10A-Parental, MCF10A-vetor vazio e MCF10A-CD90+ foram feitos na presença e ausência deste fator.

Conforme esperado, a linhagem não-tumorigênica MCF10A-Parental e a MCF10A-vetor vazio não foram capazes de formar colônias nos diferentes meios. Por outro lado, a linhagem MCF10A-CD90+ apresentou capacidade de formar numerosas colônias no meio contendo EGF e também formou uma quantidade significativa de colônias no meio sem EGF (figura 27A; Figura 27C). Foram observados cerca de 200 colônias no meio contendo EGF e 50 colônias no meio sem EGF (Figura 27B; Figura 27D), mostrando o possível potencial metastático dessa linhagem independentemente do fator de crescimento epidérmico.

Conforme o esperado, também houve formação de colônias nas linhagens tumorais Hs578T-Parental e Hs578T-non target. Foram contadas aproximadamente 80 colônias tanto da linhagem parental bem como na linhagem controle. A inibição do CD90 na linhagem tumoral Hs578T levou uma drástica redução no tamanho e no número de colônias, sendo contabilizadas cerca de no máximo 20 pequenas colônias formadas (figura 27E; figura 27F), sugerindo, assim, um baixo potencial metastático dessa linhagem.





**Figure 27: Ensaio de formação de colônias em suspensão de agarose.**

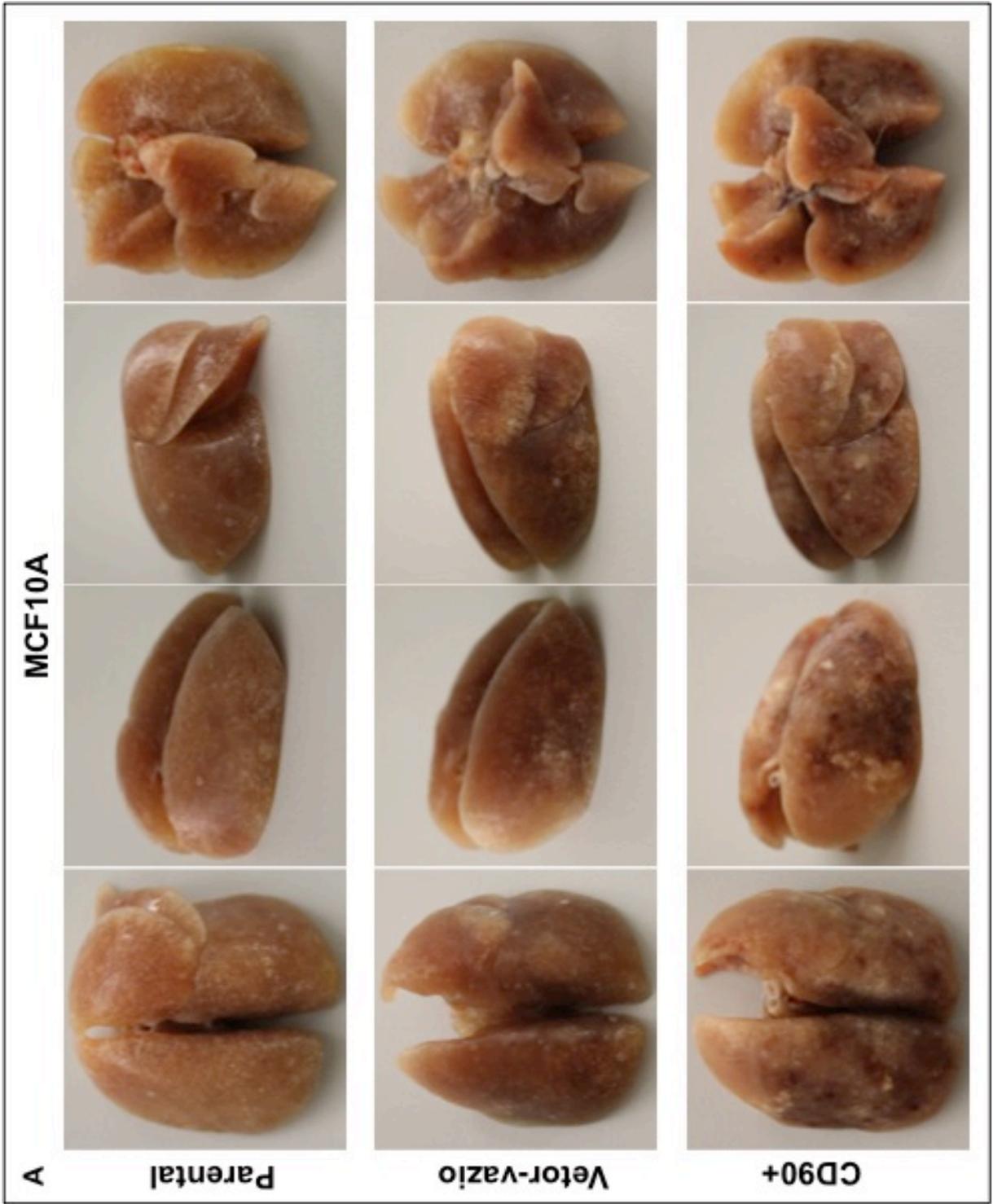
As suspensões de células ( $10^4$  células/poço) foram plaqueadas sobre a camada de agarose 0,6% em meio de cultura específico. Para a camada superior, foi utilizado agarose 0,3%. Após 21 dias, foi determinado o número de colônias e foram registradas fotomicrografias ao microscópio EVOS FI Fluorescence Imager no aumento de 100x. **(A)** Ensaio de formação de colônias das linhagens Hs578T-Parental, Hs578T-*non-target* e Hs578T-CD90- e **(B)** número de colônias totais. **(C)** Linhagens MCF10A-Parental, MCF10A-vetor vazio e MCF10A-CD90+ no meio contendo EGF e **(D)** número de colônias contadas. **(E)** Linhagens MCF10A-Parental, MCF10A-vetor vazio e MCF10A-CD90+ no meio sem EGF e **(F)** número de colônias contadas. A barra de erros representa o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas. Os asteriscos mostram as diferenças de expressão estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

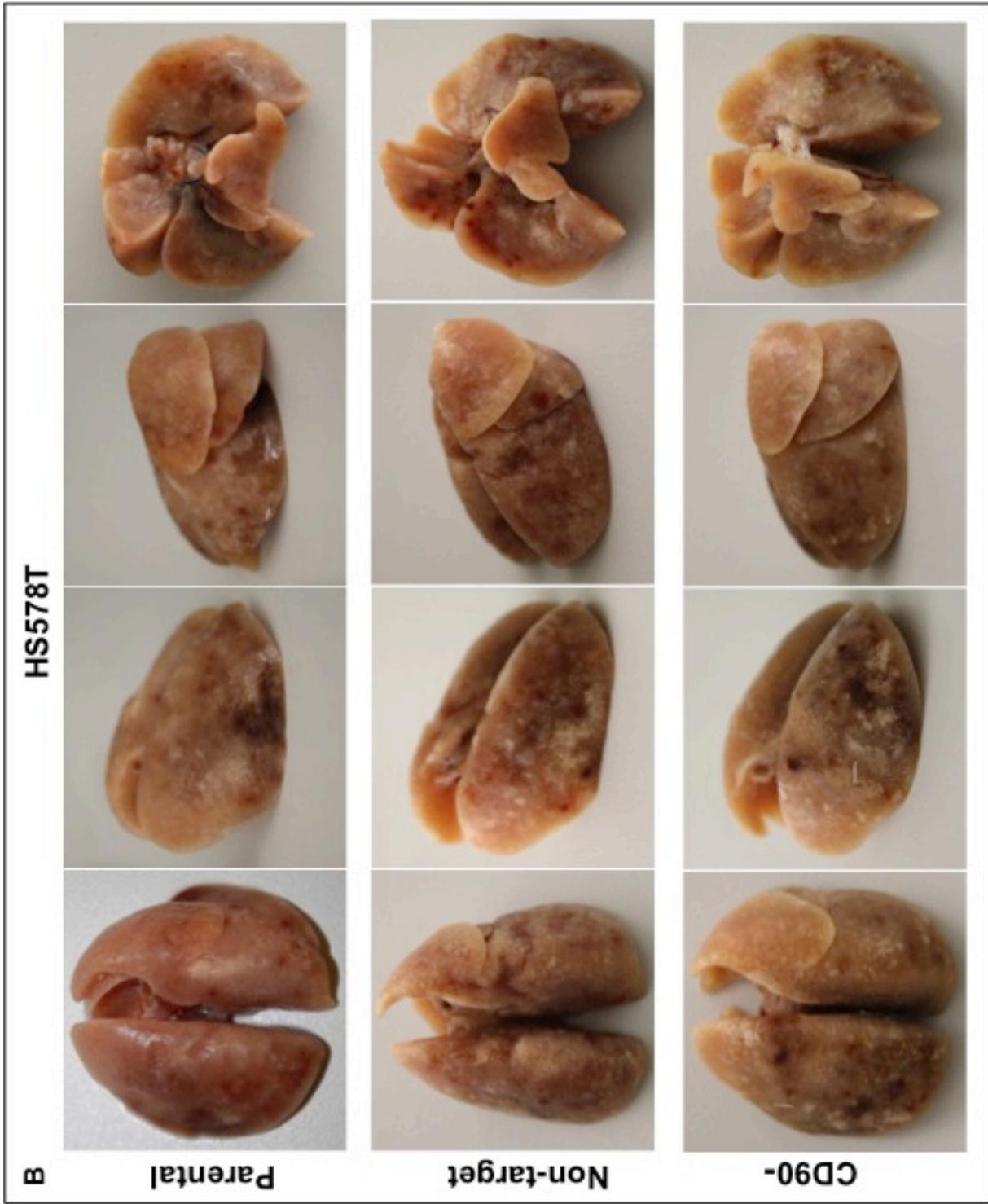
#### 4.4.6. Análise do potencial metastático *in vivo* das linhagens celulares

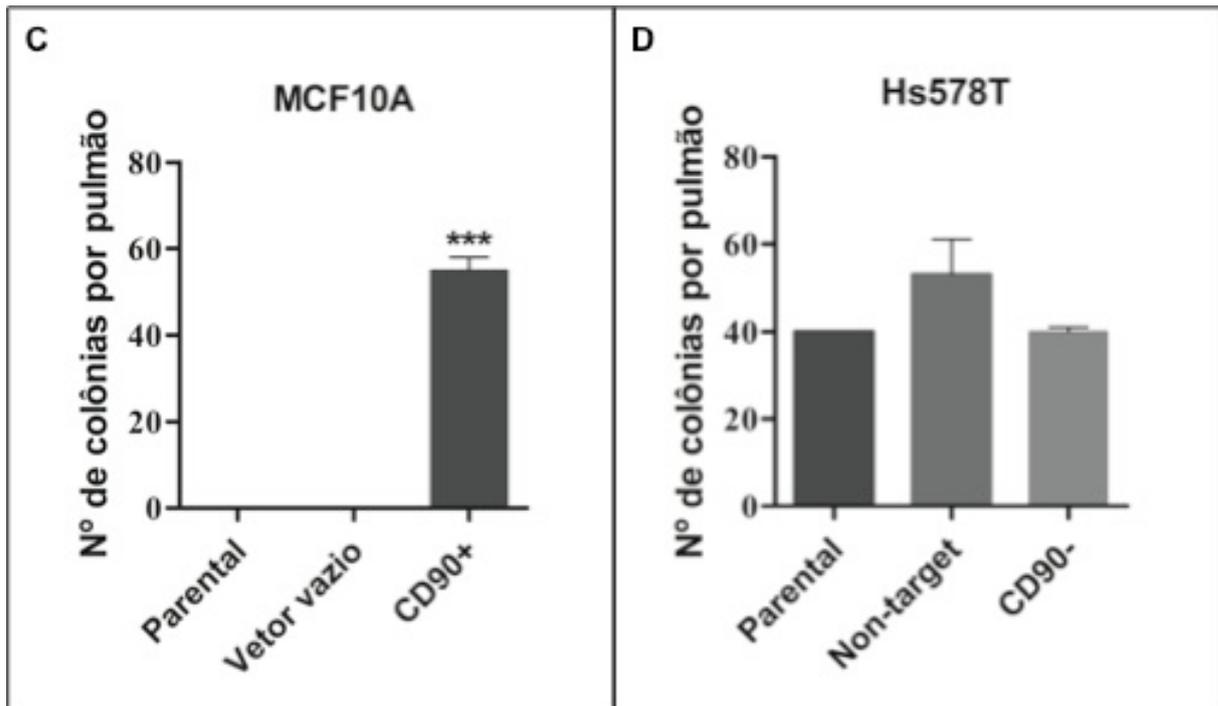
Para uma caracterização mais acurada do papel do CD90 no potencial metastático das linhagens de mama, foram realizados ensaios preliminares *in vivo* de metástase experimental em pulmão de ratos imunodeficientes.  $1 \times 10^6$  células foram injetadas via veia caudal dos animais e, após 45 dias, os pulmões foram examinados quanto ao número de colônias superficiais. Conforme esperado, nos pulmões dos ratos injetados com as células das linhagens MCF10A-Parental e

MCF10-A-vetor vazio não se observou colônia alguma. Além disso, os pulmões desses animais apresentaram uma superfície homogênea e clara (Figura 28A). Já os pulmões dos animais injetados com a linhagem MCF10-A superexpressando o CD90 apresentaram colônias na superfície e focos escuros, que podem ser regiões de necrose (Figura 28A). Foram observadas colônias nos pulmões de todos os ratos injetados com as células das linhagens Hs578T-Parental, Hs578T-*non target* e Hs578T-CD90-. Entretanto, os pulmões dos ratos injetados com as células parentais e controle apresentaram extensas regiões de necrose, conforme pode ser observado na figura 28B.

As colônias superficiais de todos os pulmões foram contadas, e os resultados são apresentados nas figuras 28C e 28D. Apesar do número de colônias observadas nos pulmões dos animais injetados com as linhagens MCF10-CD90 e Hs578T-CD90- ser maior, é importante ressaltar que as lesões e as extensas regiões de necroses dos pulmões correspondentes às linhagens Hs578T-Parental e Hs578T-*non target* dificultaram a contagem macroscópica. Estes pulmões estão em análise histológica para a avaliação patológica.







**Figure 28: Ensaio de metástase *in vivo* em pulmão de ratos injetados com as linhagens parentais e transformadas.**

$1 \times 10^6$  células foram injetadas via veia caudal em ratos imunodeficientes. Após 45 dias, os animais foram eutanasiados e os pulmões foram analisados. **(A)** Pulmões dos animais injetados com as linhagens MCF10-Parental, MCF10A-vetor vazio e MCF10-A-cd90+. **(B)** Pulmões dos animais injetados com as linhagens Hs578T-Parental, Hs578T-non target e Hs578T-CD90-. **(C)** Número de colônias na superfície dos pulmões dos animais injetados com as células das linhagens MCF10-Parental, MCF10A-vetor vazio e MCF10-A-cd90+. **(D)** Número de colônias na superfície dos pulmões dos animais injetados com as células das linhagens Hs578T-Parental, Hs578T-non target e Hs578T-CD90-.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Análise dos marcadores de células tronco

Em busca de novos marcadores que estejam relacionados com o potencial agressivo do carcinoma mamário e com a biologia de células-tronco, na primeira parte deste trabalho, analisou-se a expressão de dez marcadores de células-tronco em quatro linhagens distintas de câncer de mama e em uma linhagem não-tumorigênica.

Através da análise do nível do mRNA, foram obtidos resultados interessantes relacionando alguns dos marcadores de células-tronco com certas características das linhagens celulares de mama. A expressão do *ABCG2* foi observado apenas na linhagem MCF-7. *ABCG2* é uma proteína transportadora de membrana da família ABC (*adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette*) que funciona como uma bomba de efluxo, dependente de energia, extruindo drogas e substâncias tóxicas para o meio extracelular (Borst *et al.*, 2000). Além desta proteína ser conhecida por conferir a células tumorais uma resistência à múltiplasdrogas (Fojo & Coley, 2007), também é muito utilizada para isolar uma população específica de células com características de células-tronco, denominada *side population* (Goodell *et al.*, 1996). Esta subpopulação foi identificada em diversas linhagens tumorais, incluindo a MCF-7, estando estritamente associada a células iniciadoras de tumor e à resistência a tratamentos quimioterápicos (Patrawala *et al.*, 2005). Um fato interessante descrito por Yin e colaboradores foi que a expressão do *ABCG2* na linhagem MCF-7 é reprimida durante a transição epitélio-mesenquimal (Yin *et al.*, 2008). Assim, a expressão desse gene foi encontrada apenas em MCF-7, provavelmente, devido ao fato desta linhagem ser a única com características de células epiteliais, entre as linhagens tumorais analisadas.

Outro marcador encontrado na linhagem MCF7 foi o c-Kit. Também conhecido como CD117, o c-Kit é um receptor tirosina quinase, cujo ligante é uma proteína denominada *stem cell factor*. Este receptor possui um papel importante no desenvolvimento de células-tronco hematopoiéticas, células germinativas e melanócitos (Gibson *et al.*, 2002), estando envolvido em diversos mecanismos celulares como: proliferação, diferenciação e tumorigênese (Heinrich *et al.*, 2002). Estudos realizados em mama mostraram que o c-Kit está altamente expresso em tecidos epiteliais mamários normais e possui uma baixa expressão em tumores de mama invasivo ou metastático (Natali *et al.*, 1996; Chui *et al.*, 1996). Além disso, em estudo similar, Kondi-Patifi e colaboradores observaram uma superexpressão do c-Kit em lesões benignas mamárias e, em contraste, uma baixa expressão em carcinomas invasivo de mama (Kondi-Patifi *et al.*, 2010). Além disso, um trabalho mais recente, identificou o c-Kit na maioria das células progenitoras luminais RE(-) mamárias e mostrou que a via de sinalização desta molécula pode ser um potencial alvo para terapia ou prevenção de câncer de mama associado ao gene BRCA1 (Regan *et al.*, 2012). Assim, de acordo com esses dados e a expressão diferencial do c-Kit encontrado na linhagem MCF7, é possível sugerir que o c-Kit poderia ser um marcador de bom prognóstico no carcinoma mamário. Entretanto, para isso, é extremamente necessário uma caracterização molecular e uma investigação clínica mais completa do papel dessa molécula.

Embora o c-Kit tenha se mostrado um marcador interessante para ser estudado, o CD14 foi considerado mais promissor devido à sua alta expressão na linhagem não tumorigênica MCF10A. Apesar de ser uma molécula classicamente descrita como um componente do sistema imune, o CD14, assim como o c-Kit, também foi observado em células do tecido mamário. O primeiro relato da expressão

do CD14 em mama foi em células epiteliais luminais de camundongo em um trabalho que associou este receptor e STAT3 ao processo de involução da glândula mamária (Stein *et al.*, 2004). Posteriormente, o CD14, em conjunto com o CD61, foi identificado como novos marcadores de células progenitoras luminais mamárias (Asselin-Labat *et al.*, 2007), tendo sido utilizados para caracterizar alguns tipos celulares em uma hipotética organização hierárquica da glândula mamária (Stingl, 2009). Sustentando esses dados, um estudo mais recente de caracterização das células luminais da glândula mamária, revelou que, dentre a população de células luminais examinadas, o CD14 estava expresso em cerca de 86% das células progenitoras, confirmando a relevância desta proteína no tecido mamário (Shehata *et al.*, 2012). Funcionalmente, não se sabe o papel do CD14 nestas células, entretanto, estudos sugeriram que o CD14, identificados em células luminais ER-, pode constituir uma vantagem evolutiva para indicar a presença de bactérias no leite materno, podendo, também, ser o responsável pela inflamação que causa a mastite (Kendrick *et al.*, 2008). Uma característica relevante do CD14 é que existe uma forma solúvel, na qual a proteína perde a porção final da cauda glicosilfosfatidilinositol, que pode ser encontrada tanto no soro (Ziegler-Heitbrock and Ulevitch, 1993), como na urina (He *et al.*, 2012). Um dado interessante desta forma solúvel foi observado em pacientes com câncer de mama HER2+. Neste trabalho, foi demonstrado que pacientes com menor nível de CD14 solúvel no soro apresentaram um maior risco de recorrência da doença, em comparação com os que apresentaram um nível maior dessa proteína no soro (He *et al.*, 2012). Segundo os autores deste trabalho, o CD14 poderia ser um potencial biomarcador no prognóstico de recidiva no carcinoma mamário do subtipo HER2+. Desse modo, dentre os marcadores de células-tronco analisados neste trabalho, o CD14 foi

selecionado como o mais promissor, podendo ser um indicador de melhor prognóstico. Entretanto, este marcador deve ser caracterizado funcionalmente e avaliado em amostras de pacientes para, assim, ter respostas mais relevantes de sua função e distribuição no câncer de mama. É importante ressaltar que apesar dos resultados não terem sido apresentados neste trabalho, ambos estudos estão em andamento.

Alguns marcadores, como CD29, CD31, CD105, bem como os marcadores de células iniciadoras de mama CD44 e CD24, apresentaram expressão tanto na linhagem não-tumorigênica MCF10-A bem como em, pelo menos, uma das linhagens tumorigênicas de mama. Dessa forma, não foram selecionados para análise funcional, uma vez que não estavam diferencialmente expressos e não mostraram relação com o grau de malignidade das linhagens tumorais de mama. Já o CD200, apesar da alta expressão apenas na linhagem tumorigênica MDA-MB-435, não foi selecionado devido à origem controversa desta linhagem. Muitos trabalhos da literatura vem questionando se as células MDA-MB-435 foram realmente originadas de um carcinoma mamário, uma vez que esta linhagem possui expressão de diversos marcadores de melanoma (Brown *et al.*, 2000).

Dentre todos os marcadores analisados, o CD90 mostrou-se o mais interessante. Também conhecido como Thy-1, o CD90 é uma glicoproteína ancorada à superfície celular, tendo sido originalmente identificada em timócitos (William *et al.*, 1982; Seki *et al.*, 1985). Atualmente, o CD90 já foi descrito em diferentes tipos celulares (Haeryfar *et al.*, 2004) sendo relacionado com diversas funções distintas, tais como: ativação de células T (Fujita *et al.*, 1996), regulação do crescimento de neuritos (Tiveron *et al.*, 1992,) proliferação (Fries *et al.*, 1994), adesão e migração celular (Saalback *et al.*, 2002; He *et al.*, 1991; Barker *et al.*,

2004). Cada vez mais, o CD90 vem sendo utilizado e conhecido como marcador de células-tronco. Este receptor já foi identificado em células progenitoras hepáticas (Lázaro *et al.*, 2003; Herrera *et al.*, 2006; Dan *et al.*, 2006), células-tronco hematopoiéticas (Craig *et al.*, 1993), células progenitoras de queratinócitos (Nakamura *et al.*, 2006) e, de acordo com padrão estabelecido por Dominicci e colaboradores, o CD90 é um dos marcadores que deve estar positivo para caracterização e isolamento de células-tronco mesenquimais (Dominicci *et al.*, 2006). Além disso, em câncer, o CD90 foi identificado em alguns tipos de tumores, tendo sido caracterizado por estes trabalhos como um marcador de células iniciadoras tumorais. Em carcinoma hepatocelular, o CD90 foi identificado em uma subpopulação de células mais agressivas que foram caracterizadas como sendo células iniciadoras tumorais (Yang *et al.*, 2008). Estudos clínicos deste marcador mostraram que quanto mais elevado o nível de expressão do CD90 pior era o prognóstico do paciente portador da doença (Jeng-wei *et al.*, 2011; Sukawati *et al.*, 2013). Além disso, um estudo mais recente mostrou que a presença de células CD90+ neste carcinoma estava associada com a alta incidência de metástase à distância (Yamashita *et al.*, 2013). Estudos realizados em glioblastoma, sugeriram o CD90 não apenas como um potencial marcador de prognóstico, mas, também, como um marcador de células iniciadoras de tumor em gliomas (Liu *et al.*, 2006; He *et al.*, 2011). Em câncer de esôfago, foi mostrado que as células CD90+ apresentavam habilidade de iniciar o tumor, se diferenciar, apresentar potencial metastático e, ainda, eram resistentes à quimioterapia (Kwan Ho *et al.*, 2013). O primeiro relato do CD90 no carcinoma mamário humano é mostrado nesta tese, tendo sido obtido através da análise das linhagens celulares de mama.. Neste trabalho, foi observado que a expressão do CD90 estava relacionada com o grau de

malignidade das linhagens analisadas, sendo que cerca de 90% das células presentes na linhagem mais maligna Hs578T eram CD90+ (Lobba *et al.*, 2012). A partir desses resultados e dos dados da literatura, o CD90 foi considerado o marcador mais promissor, merecendo ser melhor investigado quanto ao seu papel funcional durante a progressão tumoral do carcinoma mamário.

## **5.2. Caracterização funcional do CD90**

Os primeiros resultados obtidos sobre a caracterização funcional mostrou que o CD90 foi capaz de alterar a morfologia celular. De acordo com os resultados, foi observada uma diminuição no tamanho e um arredondamento das células da linhagem Hs578T-CD90- e um aumento significativo do tamanho das células da linhagem MCF10-CD90+. Embora não se saiba o mecanismo exato para explicar essas mudanças, especula-se que podem ser atribuída à alteração da sinalização exercida pelo CD90 nas células. Um fato já descrito é que a proteína CD90 é co-imunoprecipitada com proteínas da família de tirosinas quinases (SFKs) (Narisawa-Saito *et al.*, 1996; Stuermer *et al.*, 2001). Acredita-se que a expressão do CD90 na membrana da célula é suficiente para inibir ativação das SFKs, levando à diminuição da fosforilação da p190RhoGAP e resultando no aumento da ativação da Rho GTPase (Barker *et al.*, 2004). A Rho GTPases são importantes reguladores da homeostase dos tecidos, trabalhando no sentido de coordenar sinais extracelulares e intracelulares em múltiplos processos celulares (Ramakers, 2002; Welsh *et al.*, 2001). A ativação da Rho GTPase promove a montagem da fibra de estresse e a formação da adesão focal (Ridley & Hall, 1992) e estes efeitos tem um impacto significativo na interação célula-substrato-, organização do citoesqueleto e progressão do ciclo celular (Barker *et al.*, 2004). Apesar destas alterações serem

apenas hipotéticas, seria interessante avaliar mais profundamente essa via, já que, teoricamente, poderia ser uma opção de alvo para terapia do carcinoma mamário.

Além da mudança morfológica, também houve alteração na proliferação das células transformadas. Foi observado que houve uma diminuição significativa na taxa de proliferação da linhagem Hs578T-CD90- e um aumento drástico na proliferação da linhagem MCF10A-CD90+. Um fato importante neste resultado foi a capacidade da linhagem MCF10A-CD90+ de proliferar independentemente da presença do EGF no meio de cultura. É importante ressaltar que, pela primeira vez, foi demonstrado que a expressão do CD90 foi capaz de manter a via de EGF ativada. Esta ativação foi constatada através do aumento da expressão da forma fosforilada do receptor e dos fatores Erk, c-Jun, e Jnk na linhagem MCF10A-CD90+ e a diminuição dos mesmos na linhagem Hs578T-CD90-. Além disso, a análise da atividade do elemento responsivo ao fator de transcrição AP1 comprovou que a via de EGF, além de estar ativada, também é funcional na linhagem MCF10-CD90. Atualmente, sabe-se que a superexpressão do EGFR no carcinoma mamário está associado com maior tamanho do tumor, com a baixa diferenciação celular e com o pior prognóstico (Sainsbury *et al.*, 1987; Salomon *et al.*, 1995). Como descrito anteriormente, este receptor é normalmente encontrado no subtipo triplo-negativo mais agressivo, *basal-like* (Burness *et al.*, 2010; Rakha *et al.* 2007), e o tratamento das pacientes apresentando este fenótipo vem sendo um desafio não apenas pela agressividade do tumor, mas, também, pela falta de uma terapia-alvo relevante. A maioria das vias de sinalizações ativadas pelo receptor de EGF é mediada por PI3 quinase, Ras-Raf-MAPK e Jnk (Downward *et al.*, 1984; Schulze *et al.*, 2005). Ao nível celular, esta via induz a proliferação celular, altera a motilidade e protege contra apoptose. Ao nível fisiológico, a ativação da via promove invasão e angiogênese

(Eccles, 2011). A desregulação da via de EGF pela superexpressão do EGFR ou pela ativação constitutiva da via pode promover a progressão tumoral, incluindo a doença metastática (Salomon *et al.*, 1995, Lurge & Lenz, 2009; Martinazzi *et al.*, 1993). Paralelamente a via de EGF, a sinalização disparada pelo CD90, embora ainda não esteja muito elucidado, também parece ter um papel na proliferação celular. Para esta função parece requerer a via da calcineurina, proteína tirosina quinase, PI-3 quinase, proteína quinase C, MAPK, Smad1 e STAT3 (Haeryfar & Hoskin, 2001; Takahashi *et al.*, 2005), podendo, assim, de alguma forma, haver uma integração que explique a ativação da via de EGF pelo CD90. Apesar da integração destas duas vias ser promissora, não foi elucidado neste trabalho se o CD90 está relacionado diretamente com a ativação da via de EGF ou se está relacionado com a regulação da expressão gênica e a produção constitutiva do EGF. Assim, para uma melhor avaliação dos mecanismos de proliferação envolvendo o EGF e o CD90, primeiramente, deve se esclarecer em qual nível ocorreu a modificação celular.

Como marcador de malignidade observou-se a expressão do receptor Neuroquinina-1 (NK1). A escolha do NK1 foi devida ao fato do gene correspondente a este receptor codificar duas formas distintas, sendo uma com o tamanho completo e a outra truncada (Fong *et al.*, 1992). A forma truncada exerce função de oncogene, estando aumentada no câncer de mama (Patel *et al.*, 2005). Nossos resultados demonstraram que houve um aumento dos níveis tanto do mRNA como da proteína da forma truncada nas células MCF10A-CD90+, sugerindo uma característica mais maligna desta linhagem. Já na linhagem Hs578T-CD90- não houve diferença significativa em relação à parental Hs578T, o que pode ser devido ao fato do silenciamento do CD90ter sido eficiente, porém ainda existir alguma expressão que pode alterar o resultado. Apesar da diferença ter sido observada apenas na

linhagem na qual o CD90 foi superexpresso, o resultado mostrou que a expressão do CD90 pode levar à expressão de um fenótipo mais maligno no câncer de mama.

Outro parâmetro caracterizado foi o papel do CD90 na tumorigênese. Para avaliar a capacidade migratória e invasiva das células, foi realizado ensaio *in vitro* utilizando elementos de membrana basal reconstituível (Matrigel™) como substrato para invasão. Os resultados desse ensaio mostraram que as células MCF10A-CD90+ foram capazes tanto de migrar como de invadir a membrana basal. As células Hs578T-CD90- apresentaram uma diminuição significativa da habilidade de migração e invasão em relação à linhagem parental. A invasividade tumoral apresentada nesse ensaio está diretamente relacionada à capacidade das células tumorais de migrarem e invadirem tecidos vizinhos, disseminando-se via circulação sanguínea e linfática. A plasticidade de células epiteliais e a perda de diferenciação são um marco na progressão maligna durante as fases invasivas e metastáticas. Nas etapas iniciais do processo metastático, as células tumorais sofrem alterações morfológicas que envolve perda da polaridade, perda do contato com células vizinhas e a subsequente dispersão após aquisição de motilidade (Thiery and Sleeman, 2006). Sabe-se que essa mudança morfológica ocorre devido à reorganização do citoesqueleto através da atividade da proteína Rho GTPase (Barker *et al.*, 2004). Conforme descrito anteriormente, aparentemente, o CD90 pode interagir tanto com integrinas como com tirosinas quinases citoplasmáticas, as quais podem levar à ativação da proteína Rho GTPase e, conseqüentemente, à migração celular (Wetzel *et al.*, 2004, Saalback *et al.*, 2005), reforçando, novamente, a importância da via do CD90 na progressão tumoral do câncer de mama.

Outro processo relacionado com as alterações morfológicas que levam à invasão é o processo de transição epitélio-mesenquimal. Como já foi descrito, este

processo é caracterizado pela mudança do fenótipo epitelial para o fenótipo mesenquimal. Essa alteração envolve desarranjo de junções aderentes e desmossomos, bem como a reorganização dos complexos celulares de adesão ao substrato. Após perda de polaridade, o citoesqueleto é significativamente remodelado. A substituição do filamento intermediário de citoqueratina por vimentina é considerado um importante critério na ocorrência da transição (Petersen *et al.*, 2001; Savanger, 2001; Thiery, 2003; Vicent-Salomon & Thiery, 2003). Os resultados mostraram que tanto a expressão do CD90 na linhagem MCF10A, quanto sua inativação na linhagem HS578T levou a alterações de marcadores da transição epitélio-mesenquimal. Foi observado um aumento da expressão dos marcadores mesenquimais, vimentina e n-caderina, na linhagem MCF10A-CD90+ e uma diminuição desses marcadores na linhagem Hs578T-CD90-. Entretanto, não se observou uma diferença significativa na expressão do marcador epitelial E-caderina nas linhagens transformadas. Entretanto, este marcador deverá ser analisado através da técnica de imunofluorescência, já que, em alguns casos, durante a transição epitélio-mesenquimal, não é observada a diminuição da expressão da E-caderina e, sim, sua translocação da membrana para o citoplasma.

O aumento da expressão dos marcadores mesenquimais nas linhagem MCF10A-CD90+ sugere que o CD90 pode de alguma forma iniciar a transição das células para o fenótipo mesenquimal sem estímulos extracelulares e fatores presentes no microambiente. Dessa forma, de acordo com a hipótese proposta pela Figura 5 estas células seriam mais propícias a migrarem e reverterem o fenótipo mesenquimal no sítio secundário distante.

Ainda relacionado com o processo de invasão e metástase, também deve ser mencionado que, durante a invasão, ocorre uma complexa cascata de eventos,

incluindo a quebra organizada dos componentes da matriz extracelular por metaloproteinases de matriz (MMPs) (Itoh & Nagase, 2002). Um dado interessante, descrito por Tang e colaboradores, mostrou que células iniciadoras de tumor de esôfago CD90+ apresentaram uma elevada expressão de metaloproteinases envolvidas na carcinogênese (Tang *et al.*, 2013). Embora o estudo das MMPs não tenha sido o foco inicial do trabalho, a análise desses fatores será de extrema importância para complementar a caracterização do papel CD90 na tumorigênese de mama.

Para completar a caracterização da natureza tumorigênica do CD90, o potencial metastático das linhagens celulares foi avaliado através de ensaios *in vitro* de formação de colônia em meio semi-sólido e ensaios *in vivo* de metástase experimental em pulmão de ratos imunodeficientes do tipo *nude*. O ensaio *in vitro* tem sido classicamente utilizado para demonstrar a propensão de linhagens celulares à metástase. Os resultados publicados sugerem que é possível estabelecer uma correlação entre a capacidade de crescimento de células tumorais em agarose com a capacidade proliferativa destas células em sítios específicos de metástase (Lee & Welch, 1997, Li *et al.*, 1989).

*In vivo*, o processo de metástase pode ser avaliado experimentalmente através de ensaios nos quais as células tumorais são injetadas ortotópica ou diretamente na circulação de animais experimentais. Estes ensaios são chamados, respectivamente, de metástase espontânea e metástase experimental. Em ambos os casos, a etapa fina do ensaio consiste na formação de metástases visíveis em sítios secundários.

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios, foi observado que a linhagem MCF10A-CD90+ apresentou células com capacidade metastática. Já a linhagem Hs578T-CD90- apresentou uma menor propensão metastática *in vitro*. A partir deste ensaio, foi possível confirmar que o CD90 foi responsável pela malignização celular no câncer de mama.

Assim, pela primeira vez, o CD90 foi caracterizado funcionalmente como um marcador envolvido na transformação maligna do carcinoma mamário. Diversos mecanismos hipotéticos de possíveis vias do CD90 foram correlacionados com as mudanças celulares durante o processo de tumorigênese da mama. Esses mecanismos deverão ser estudados não só para o melhor entendimento da biologia do câncer de mama, mas, também, para o desenvolvimento de terapias-alvo mais específicas. Além disso, é essencial que se faça um estudo clínico do CD90 para correlacionar a expressão deste receptor com os parâmetros moleculares e anatopatológicos que são utilizados nos atuais protocolos clínicos, para que se possa, assim, sugerir o CD90 como um novo marcador molecular que poderá complementar os prognósticos das pacientes portadoras do carcinoma mamário. Para perseguir este objetivo, uma colaboração foi montada com pesquisadores/médicos da Faculdade de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, para se ter acesso não só a amostras tumorais e normais de mama, mas, também, aos prontuários das pacientes. Este estudo está em andamento, com um grande número de amostras tendo sido coletadas e processadas.

## 6. CONCLUSÃO

Neste presente trabalho, através da análise de diversos marcadores de células tronco, foi identificado um marcador, o CD90, que estava relacionado com o grau de malignidade das linhagens tumorais analisadas. Buscando entender melhor o papel do CD90 na progressão tumoral mamária, foi realizado um ensaio funcional através da superexpressão deste marcador na linhagem de mama não-tumorigênica e o silenciamento na linhagem tumoral mamária mais agressiva. De acordo com o estudos realizados, foi demonstrado que o CD90 está envolvido com diversos processos celulares que podem levar a transformação maligna, tais como, a alteração morfológica das células, aumento da proliferação celular, ativação da via de EGF, expressão de marcadores de malignidade, invasão e metástase. Assim, pela primeira vez, foi demonstrado que o CD90 está envolvido com o processo de malignização no câncer de mama. Além disso, coletivamente, os dados obtidos neste estudo estendem o conhecimento para o entendimento da biologia do câncer de mama, contribuindo, assim, para futuros estudos que visam o desenvolvimento de novos protocolos clínicos e terapêuticos.

## 7. PERSPECTIVAS

Os dados obtidos neste trabalho permitem propor as seguintes perspectivas para a continuação deste estudo:

- Repetir o ensaio de tumorigênese *in vivo*.
- Analisar anato-patologicamente os pulmões dos ratos do ensaio *in vivo*.
- Analisar a expressão dos marcadores moleculares utilizados na classificação dos subtipos de tumores mamários (RE, RP e HER2) nas linhagens transformadas com o CD90
- Analisar os marcadores de transição epitélio-mesenquimal utilizando a técnica de imunohistoquímica
- Avaliar se a linhagem MCF10A passa a expressar o CD90 após o tratamento com TGF- $\beta$
- Analisar os genes de pluripotência (OCT-4, Nanog, Sox2 e Klf4) nas linhagens transformadas com CD90
- Analisar a expressão das metaloproteinases de matriz e seus inibidores nas linhagens transformadas com o CD90
- Avaliar a capacidade das células transformadas com CD90 de formar mamoesferas
- Avaliar a viabilidade celular após o tratamento quimioterápico
- Caracterizar o CD14 na linhagem MCF10A e Hs578T através do ensaio funcional

- Analisar a expressão do CD90 e do CD14 em amostras de pacientes portadoras de câncer de mama e correlacionar com os dados clínicos

## 8. REFERÊNCIAS

Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res* 2005;11:1154–1159.

Ahmed MA, Aleskandarany MA, Rakha EA, Moustafa RZ, Benhasouna A, Nolan C, Green AR, Ilyas M, Ellis IO. A CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> phenotype is a poor prognostic marker in early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;133:979–995.

Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, Clarke MF. Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14(1):43-7.

Allred DC, Mohsin SK, Fuqua AS. Histologica and biological evolution of human premalignante breast disease. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:47-61.

Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Barker H, Thomas R, Shackleton M, Forrest NC, Hartley L, Robb L, Grosveld FG, van der Wees J, Lindeman GJ, Visvader JE. Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(2):201-9.

Barker TH, Grenett HE, MacEwen MW, Tilden SG, Fuller GM, Settleman J, Woods A, Murphy-Ullrich J, Hagood JS. Thy-1 regulates fibroblast focal adhesions, cytoskeletal organization and migration through modulation of p190 RhoGAP and Rho GTPase activity. *Exp Cell Res* 2004;295:488–496.

Bissell MJ & Radisk D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 2001; 1, 46-54.

Blair A, Hogge DE, Sutherland HJ. Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo have the phenotype

CD34(+)/CD71(-)/HLA-DR-. *Blood* 1998; 92:4325–35.

Blair A, Sutherland HJ. Primitive acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo* lack surface expression of c-kit (CD117). *Exp Hematol* 2000; 28:660–71.

Böcker W, Moll R, Poremba C, Holland R, Van Diest PJ, Dervan P, Bürger H, Wai D, Ina Diallo R, Brandt B, Herbst H, Schmidt A, Lerch MM, Buchwallow IB. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab. Invest* 2002; 82:737–746.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3:730-7.

Borst P, Evers R, Kool M. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1295-302.

Brown PO, Ross DT, Scherf U, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 2000;24:227–235.

Burness ML, Grushko TA, Olopade OI. Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker? *Cancer J* 2010; 16:23–32

Cailleau R, Olive M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 1978; 14:911-5.

Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*. 2007; 6:2332-8.

Chui X, Egami H, Yamashita J, Kurizaki T, Ohmachi H, Yamamoto S, Ogawa M: Immunohistochemical expression of the c-kit proto-oncogene product in human malignant and non-malignant breast tissues. *Br J Cancer*, 73: 1233-1236, 1996.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005; 65(23):10946-51.

Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1993;177:1331–1342.

Crocker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *J Cell Mol Med* 2008;12(2):374-90.

Dan YY, Riehle KJ, Lazaro C, Teoh N, Haque J, Campbell JS, Fausto N. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:9912–9917.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–317.

Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*. 2003;17(10):1253-70.

Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 1984; 307:521–527.

DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol.* 1987; 7(1):379-87.

Eccles SA. The epidermal growth factor receptor/Erb-B/ HER family in normal and malignant breast biology. *Int J Dev Biol* 2011; 55:685–696

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998). "Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment". *Genome Res.* 8 (3): 175–185.

Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 2005; 65(20):9328-37.

Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2008;10(2):R25.

Fojo T, Coley HM. The role of efflux pumps in drug-resistant metastatic breast cancer: new insights and treatment strategies. *Clin Breast Cancer.* 2007 Oct;7(10):749-56.

Fong TM, Anderson SA, Yu H, Huang RR, Strader CD. Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor. *Mol Pharmacol.* 1992; 41(1):24-30.

Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, Phipps RP. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72:283–292.

Fujita N, Kato Y, Naito M, Tsuruo T. A novel anti-Thy-1 (CD90) monoclonal antibody induces apoptosis in mouse malignant T-lymphoma cells in spite of inducing bcl-2 expression. *Int J Cancer* 1996;66:544–550.

Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW, Ghivizzani SC, Ignatova TN, Steindler DA. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia*. 2005; 7(11):967-76.

Gibson PC, Cooper K: CD117 (KIT): a diverse protein with selective applications in surgical pathology. *Adv Anat Pathol*, 9: 65-69, 2002.

Globocan, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Globocan Project 2012-  
[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) (19 de fevereiro de 2013, 23h46min).

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RS. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* 1996; 183:1797–1806.

Hackett AJ, Smith HS, Springer EL, Owens RB, Nelson-Rees WA, Riggs JL, Gardner MB. Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58:1975-806.

Haeryfar SM, Hoskin DW. Selective pharmacological inhibitors reveal differences between Thy-1- and T cell receptor-mediated signal transduction in mouse T lymphocytes. *Int Immunopharmacol* 2001;1:689–98.

Haeryfar SMM, Hoskin DW. Thy-1: More than a mouse pan-T cell marker. *J Immunol* 2004;173:3581–3588.

Hay JG, McElvaney NG, Herena J, Crystal RG. Modification of nasal epithelial potential differences of individuals with cystic fibrosis consequent to local administration of a normal CFTR cDNA adenovirus gene transfer vector. *Hum Gene Ther.* 1995;6:1487–1496.

He HT, Naquet P, Caillol D, Pierres M. Thy-1 supports adhesion of mouse thymocytes to thymic epithelial-cells through a Ca<sup>2</sup>(1)-independent mechanism. *J Exp Med* 1991;173:515–518.

He J, Liu Y, Zhu T, Zhu J, Dimeco F, Vescovi AL, Heth JA, Muraszko KM, Fan X, Lubman DM. CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Mol Cell Proteomics.* 2012; 11(6):M1111.010744.

He S, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009;25:377-406.

He W, Huang C, Luo G, Dal Prà I, Feng J, Chen W, Ma L, Wang Y, Chen X, Tan J, Zhang X, Armato U, Wu J. A stable panel comprising 18 urinary proteins in the human healthy population. *Proteomics.* 2012; 12(7):1059-72.

Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, Fletcher JA: Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum Pathol*, 33: 484-495, 2002.

Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human

liver. *Stem Cells* 2006;24:2840–2850.

Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lövgren K, Grabau D, Fernö M, Borg A, Hegardt C. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2008;10(3):R53

Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 2004; 5:738–43.

INCA - Instituto Nacional do Cancer, disponível na internet <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/> (19 de fevereiro de 2013, 23h51min).

Itoh Y, Nagase H. Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem.* 2002;38:21-36.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial–mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119:1420–8.

Kendrick H, Regan JL, Magnay FA, Grigoriadis A, Mitsopoulos C, Zvelebil M, Smalley MJ. Transcriptome analysis of mammary epithelial subpopulations identifies novel determinants of lineage commitment and cell fate. *BMC Genomics.* 2008 Dec; 9:591.

Kondi-Pafiti A, Arkadopoulos N, Gennatas C, Michalaki V, Frangou-Plegmenou M, Chatzipantelis P. Expression of c-kit in common benign and malignant breast lesions. *Tumori.* 2010; (6):978-84.

Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annual review of immunology* 2003;21:759–806.

Krizhanovsky V, Lowe SW. Stem cells: The promises and perils of p53. *Nature*. 2009 ;460(7259):1085-6.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367(6464):645-8.

Lanigan F, O'Connor D, Martin, F, Gallaghe WM. Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 2007;64, 3159-3184.

Lázaro CA, Croager EJ, Mitchell C, Campbell JS, Yu C, Foraker J, Rhim JA, Yeoh GC, Fausto N. Establishment, characterization, and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes. *Hepatology*. 2003; 38(5):1095-106.

Lee JA, Spidlen J, Boyce K, Cai J, Crosbie N, Dalphin M, et al. MIFlowCyt: The minimum information about a flow cytometry experiment. *Cytometry A* 2008;73A:926– 930.

Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res*. 1997;57(12):2384-7.

Li C, Lee CJ, Simeone DM. Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods Mol Biol*. 2009; 568:161-73.

Li L, Price JE, Fan D, Zhang RD, Bucana CD, Fidler IJ. Correlation of growth capacity of human tumor cells in hard agarose with their in vivo proliferative capacity at specific metastatic sites. *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81(18):1406-12.

Li Y, Welm B, Podsypanina K, Huang S, Chamorro M, Zhang X, Rowlands T, Egeblad M, Cowin P, Werb Z, Tan LK, Rosen JM, Varmus HE. Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:15853–15858.

Liu GT, Yuan XP, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133(1) cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006; 5:67.

Lobba AR, Forni MF, Carreira AC, Sogayar MC. Differential expression of CD90 and CD14 stem cell markers in malignant breast cancer cell lines. *Cytometry A.* 2012;81(12):1084-91.

Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23:675-99

Lu JW, Chang JG, Yeh KT, Chen RM, Tsai JJ, Hu RM. Overexpression of Thy1/CD90 in human hepatocellular carcinoma is associated with HBV infection and poor prognosis. *Acta Histochem.* 2011; 113(8):833-8.

Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 2009; 77:400–410

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133:704–715.

Martinazzi M, Crivelli F, Zampatti C, Martinazzi S. Relationships between epidermal growth factor receptor (EGF-R) and other predictors of prognosis in breast carcinomas. An immunohistochemical study. *Pathologica* 1993; 85:637–644

Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell* 2007; 13;1(6):635-45.

Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, Smith BD, Civin CI, Jones RJ. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*. 2004;103(6):2332-6.

May CD, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W, Mani SA. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2011;13(1):202.

Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakis E, Nomikos A, Magkou C, Bakarakos P, Nakopoulou L. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>(-/low)</sup> and CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup> tumor cells in invasive breast carcinomas. *Hum Pathol* 2008;39(7):1096–1102.

Morel A-P, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, et al. (2008) Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE* 3(8): e2888.

Nakamura Y, Mugeruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sakai D, Mochida J, Hotta T, Ando K. Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *Br J Dermatol*. 2006 Jun;154(6):1062-70.

Narisawa-Saito M, Yamanashi Y, Morioka T, Oite T, Shimizu F. Thy-1 molecule associates with protein tyrosine kinase(s) in rat mesangial cells. *Clin Exp Immunol*. 1996 October; 106(1): 86–90.

Natali PG, Nicotra MR, Sures I, Mottolese M, Botti C, Ulrich A: Breast cancer is associated with loss of the c-kit oncogene product. *Int J Cancer*, 52: 713-717, 1992.

National Institutes of Health, NIH, disponível em [http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative\\_Medicine/pages/2006chapter9.aspx](http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/pages/2006chapter9.aspx) – (21 de fevereiro de 2014, 01h50min)

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5367- 74.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007 J;445(7123):106-10.

Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;51(3):195-208.

Patel HJ, Ramkissoon SH, Patel PS, Rameshwar P. Transformation of breast cells by truncated neurokinin-1 receptor is secondary to activation by preprotachykinin-A peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(48):17436-41.

Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and

ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res.* 2005 Jul 15;65(14):6207-19.

Perez-Pomares JM, Munoz-Chapuli R. Epithelial–mesenchymal transitions: a mesodermal cell strategy for evolutive innovation in Metazoans. *Anat Rec* 2002;268:343–51.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT- PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;1;29:e45.

Petersen OW, Lind Nielsen H, Gudjonsson T, Villadsen R, Rønnov-Jessen L, Bissell MJ. The plasticity of human breast carcinoma cells is more than epithelial to mesenchymal conversion. *Breast Cancer Res.* 2001;3(4):213-7.

Ponti D, Costa A, Zaffarano N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005; 65:5506-11.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(3):973-8.

Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest.* 2007 Nov;117(11):3155-63.

Radisky DC, LaBarge MA. Epithelial-mesenchymal transition and the stem cell phenotype. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(6):511-2.

Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007; 109:25–32

Ramakers GJ. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci*. 2002; 25(4):191-9.

Regan JL, Kendrick H, Magnay FA, Vafaizadeh V, Groner B, Smalley MJ. c-Kit is required for growth and survival of the cells of origin of Brca1-mutation-associated breast cancer. *Oncogene*. 2012; 31(7):869-83

Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol*. 1996; 175(1):1-13.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007; 445(7123):111-5.

Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 1992; 70(3):389-99.

Saalbach A, Hildebrandt G, Haustein UF, Anderegg U. The Thy-1/Thy-1 ligand interaction is involved in binding of melanoma cells to activated Thy-1-positive microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 2002;64:86–93.

Saalbach A, Wetzel A, Haustein UF, Sticherling M, Simon JC, Anderegg U. Interaction of human Thy-1 (CD 90) with the integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 (CD51/CD61): an

important mechanism mediating melanoma cell adhesion to activated endothelium. *Oncogene* 2005;24:4710–20.

Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL. Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet* 1987; 1:1398–1402

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;19:183–232

Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays*. 2001;23(10):912-23.

Schulze WX, Deng L, Mann M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* 2005; 1:2005–2008

Seki T, Spurr N, Obata F, Goyert S, Goodfellow P, Silver J. The human Thy-1 gene. Structure and chromosomal location. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:6657–6661.

Serakinci N, Guldborg P, Burns JS, Abdallah B, Schroder H, Jensen T, Kassem M. 2004. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 2004; 23:5095–5098.

Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 2006; 439:84-88.

Shehata M, Teschendorff A, Sharp G, Novcic N, Russell A, Avril S, Prater M, Eirew P, Caldas C, Watson CJ, Stingl J. Phenotypic and functional characterization of the

luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Res.* 2012 Oct 22;14(5):R134.

Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 2004; 23(43):7267-73.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432(7015):396-401.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(19):10869- 74.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al . Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(14):8418-23.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Isnt* 1973; 51:1409-16.

Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD Jr, Brenz R, McGrath CM, Russo J, Pauley RJ, Jones RF, Brooks SC. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial-cell line, MCF-10. *Cancer Res* 1990;50:6075– 6086.

Stein T, Morris JS, Davies CR, Weber-Hall SJ, Duffy MA, Heath VJ, Bell AK, Ferrier RK, Sandilands GP, Gusterson BA. Involution of the mouse mammary gland is associated with an immune cascade and an acute-phase response, involving LBP, CD14 and STAT3. *Breast Cancer Res.* 2004; 6(2):R75-91.

Sternlicht MD. Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res* 2006; 8, 201.

Stingl J. Detection and analysis of mammary gland stem cells. *J Pathol* 2009;217:229– 241.

Stuermer CA, Lang DM, Kirsch F, Wiechers M, Deininger SO, Plattner H. Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2. *Mol Biol Cell*. 2001; 12(10):3031-45.

Sukowati CH, Anfuso B, Torre G, Francalanci P, Crocè LS, Tiribelli C. The expression of CD90/Thy-1 in hepatocellular carcinoma: an in vivo and in vitro study. *PLoS One*. 2013; 8(10):e76830.

Takahashi T, Abe H, Arai H, Matsubara T, Nagai K, Matsuura M, Iehara N, Yokode M, Nishikawa S, Kita T, Doi T. Activation of STAT3/Smad1 is a key signaling pathway for progression to glomerulosclerosis in experimental glomerulonephritis. *J Biol Chem* 2005;280:7100–6.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126(4):663-76.

Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA, Inoue K. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin Med Insights Oncol*. 2010; 4:15-34.

Tang KH, Dai YD, Tong M, Chan YP, Kwan PS, Fu L, Qin YR, Tsao SW, Lung HL, Lung ML, Tong DK, Law S, Chan KW, Ma S, Guan XY. A CD90(+) tumor-initiating

cell population with an aggressive signature and metastatic capacity in esophageal cancer. *Cancer Res.* 2013; 73(7):2322-32

Terstappen LW, Huang S, Safford M, et al. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38– progenitor cells. *Blood* 1991. 77:1218–27.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15(6):740-6.

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:131–42.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA: Epithelial–mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009, 139:871-890.

Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protoc.* 2006;1(1):241-5.

Tiveron MC, Barboni E, Pliego Rivero FB, Gormley AM, Seeley PJ, Grosveld F, Morris R. Selective inhibition of neurite outgrowth on mature astrocytes by Thy-1 glycoprotein. *Nature* 1992;355:745–748.

Van t Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002;415(6871):530-6.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by

geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.

Vermeulen L, Sprick MR, Kemper K, Stassi G, Medema JP. Cancer stem cells—old concepts, new insights. *Cell Death Differ*. 2008;15(6):947-58.

Vincent-Salomon A, Thiery JP. Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development. *Breast Cancer Res*. 2003;5(2):101-6.

Weigelt B, Peterse JL & van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005; 5, 591-602.

Welsh CF, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assoian RK. Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol*. 2001; 3(11):950-7.

Wetzel A, Chavakis T, Preissner KT, Sticherling M, Haustein UF, Anderegg U, Saalbach A. Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Immunol* 2004;172:3850–9.

Williams AF, Gagnon J. Neuronal cell Thy-1 glycoprotein—Homology with immunoglobulin. *Science* 1982;216:696–703.

Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Rosen JM. On mammary stem cells. *J. Cell Sci*. 2005; 118; 3585–3594.

Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S. Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013 ;57(4):1484-97.

Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Significance of CD90(1) cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 2008;13:153–166.

Yin L, Castagnino P, Assoian RK. ABCG2 expression and side population abundance regulated by a transforming growth factor  $\beta$ -directed epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2008; 68(3).

Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 1993; 14:121-125.

# Aline Ramos Maia Lobba

**Endereço residencial:** Rua Dr. Augusto de Miranda, 408  
05026-000 - São Paulo, SP – Brasil

**Endereço profissional:** Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo  
Av. Prof. Lineu Prestes, 748 sala 964  
05508-000 – São Paulo, SP - Brasil

**Telefones:** +55 11 3091-9047 (trabalho)  
+55 11 3042-0280 (residencial)  
+55 11 99751-9340 (celular)

**Fax:** +55 11 3091-3820

**E-mail:** aline.maia@iq.usp.br  
aline.maia@gmail.com

**Local/data de nascimento:** de Itaguaí - Rio de Janeiro – Brasil  
28.01.1981

**Nacionalidade:** Brasileira

**RG:** 53.627.824-6

**CPF:** 054.302.137.80

**Estado civil:** Casada

**Idiomas:** Português (materna)  
Inglês (avançado)

## Formação acadêmica/titulação

---

- 2008** Doutorado em andamento em Bioquímica e Biologia Molecular.  
  
Departamento de Bioquímica (conceito CAPES 7), Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.
- 2003 - 2007** Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas Modalidade Médica. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO. Rio de Janeiro, Brasil.
- 1996 - 1999** Ensino Médio (2º grau).  
  
Colégio 5 de Julho, Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil
- 1992 - 1995** Ensino Fundamental (1º grau).  
  
Colégio Cenecista Luiz Murat, Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil

## Projetos de pesquisa e bolsas

---

- 2008** Doutorado em andamento  
  
Título de tese: Presença de marcadores de células-tronco em linhagens celulares humanas de câncer de mama: possível valor em diagnóstico, prognóstico e terapia.  
  
Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM), Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.  
  
Orientadora: Profa. Dra. Mari C. Sogayar  
  
Bolsista FAPESP.
- Set 2012 – Abr 2013** Doutorado sanduíche  
  
Laboratory of Medicine-Hematology/Oncology, coordenado pelo Profa. Dra. Pranela Rameshwar, na faculdade de medicina da Rutgers New Jersey Medical School (ULB), New Jersey, Estados Unidos.  
  
Título: Caracterização funcional do marcador CD90

Orientadora: Dra. Pranela Rameshwar

Bolsista FAPESP

**2005 – 2007** Iniciação científica

Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

Título: Estudo do promotor do gene *galanina* em células tronco embrionárias de camundongo Orientadora: Profa. Dra. Leticia Labriola

Bolsista: Programa de iniciação científica da Fiocruz

## Produção Bibliográfica

---

### *Artigos completos publicados em periódicos*

1. Bibber B, Sinha G, **Lobba ARM**, Greco SJ, Rameshwar P. A Review of Stem Cell Translation and Potential Confounds by Cancer Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2013;2013:241048.
2. **Lobba, ARM**; Forni MF; Carreira, ACO; Sogayar, MC. Differential Expression of CD90 and CD14 Stem Cells Markers in Malignant Breast Cancer Cell Lines. *Cytometry A.* 2012 Dec; 81(12):1084-91

### *Capítulos de livros*

1. Demasi MAA, Carreia AC, Goms LR, Lima MT, **Lobba ARM**, Lojudice FH, Degaki TL, Montor W, Fujita A, Sogayar MC. Genômica Funcional em Oncologia. *Tratado de Oncologia.* Editora Atheneu. 2012. ISBN: 8538803123

### *Resumos publicados em anais de congressos*

1. **Lobba, ARM**; Carreira, ACO; Garcia, T; Rameshwar P; Sogayar, MC. Functional Analysis of CD90 in Normal and Breast Cancer Cell lines. XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2013, Paraná, Brasil
2. **Lobba, ARM**; Forni MF; Carreira, ACO; Sogayar, MC. Differentially Expressed Stem Cell Markers in Breast Cancer Stem cells. 10th International Congress on Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology (SBBC), 2012, Rio de Janeiro, Brasil
3. **Lobba, ARM**; Forni MF; Garcia TR; Carreira, ACO; Sogayar, MC. II Congresso do Insitituto de Química, 2012, São Paulo, Brasil

4. **Lobba, ARM**; Forni MF; Perozzi C; Carreira, ACO; Labriola L; Sogayar, MC. Differentially Expressed Stem Cell Markers in Breast Cancer Cell Lines. 102nd Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2011 (AACR), 2011, Flórida, Estados Unidos..
5. **Lobba, ARM**; Forni MF; Perozzi C; Carreira, ACO; Labriola L; Sogayar, MC. Differentially Expressed Stem Cell Markers in Breast Cancer Cell Lines. VI Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular, 2011, Bahia, Brasil.
6. **Lobba, ARM**; Forni MF; Perozzi C; Carreira, ACO; Labriola L; Sogayar, MC. Differentially Expressed Stem Cell Markers in Breast Cancer Cell Lines. XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2011, Paraná, Brasil..
7. Forni MF, Polizel LS, **Lobba ARM**, Limma MT, Sogayar MC. Oxidative Stress Mediated Senescence of Skin Stem Cells. New insights in Healthspan a Diseases of Ageing: From Molecular to Functional Senescence. Keystone Symposia, 2010, Califórnia, Estados Unidos.
8. **Lobba, ARM**; Forni MF; Perozzi C; Carreira, ACO; Sogayar, MC. Stem Cell Markers are Differentially Expressed in Breast Cancer Cell Lines. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) – 1st Latin American Symposium on the Molecular Mechanisms of Skeletal Mineralization, 2010, Paraná, Brasil.
9. Forni MF, **Lobba ARM**, Polizel LS, Sogayar MC. Skin as a Promising Source of Stem Cells for Cell Therapy. IV Simpósio Internacional de Terapias Avançadas e Células-Tronco, 2009, Pernambuco, Brasil..
10. Forni MF, **Lobba ARM**, Polizel LS, Sogayar MC. Isolation, Characterization and Differentiation of Three Different Skin Stem Cells. StemCells, 2009, Bolans Village, Antigua
11. Forni MF, **Lobba ARM**, Polizel LS, Halscsik E, Sogayar MC. Proliferation Senescence and Death of Skin Stem Cell Induced By Hydrogen Peroxide. Primeiro Encontro de Pós Graduação do Instituto de Química, 2009, São Paulo, Brasil.
12. Forni MF, **Lobba ARM**, Belchior GG, Halscsik E, Sogayar MC. Proliferation, Senescence and Death of Mesenchymal Skin Stem Cell. XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2009, São Paulo, Brasil.
13. **Lobba ARM**, Forni MF, Belchior GG, Halscsik E, Carreira ACO, Sogayar MC. Cancer Stem Cells in Breast Cancer Cell Lines. XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2009, São Paulo, Brasil.
14. **Maia AR**; Gonzales S; Fonseca LCG; Amorim L; Abdelhay E. Estudo da Regulação do Promotor do Gene Galanina em Células Tronco Embrionárias de Camundongo. III Jornada Científica do INCA, 2006, Rio de Janeiro, Brasil.

## Experiência acadêmica

---

### *Organização de cursos e monitoria*

#### *Disciplinas de pós-graduação*

1. VIII Curso de Inverno - Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular, junto ao departamento de Bioquímica da USP. 2013. Atividade: monitoria plena e aula prática de extração de mRNA proteínas, qRT-PCR e interpretação dos resultados.
2. Biologia Molecular da Transformação Maligna (QBQ5717), junto ao departamento de Bioquímica da USP, sob a orientação da Profa. Dra. Mari C. Sogayar. 2011. Atividade: aulas teóricas e práticas da Técnica Ensaio de Mobilidade Eletroforética EMSA – Gel Shift.
3. Biologia Molecular da Transformação Maligna (QBQ5717), junto ao departamento de Bioquímica da USP, sob a orientação da Profa. Dra. Mari C. Sogayar. 2009. Atividade: aulas teóricas e práticas da Técnica Ensaio de Mobilidade Eletroforética EMSA – Gel Shift.
4. III Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular, junto ao departamento de Bioquímica da USP. 2008. Atividade: monitoria plena e aula prática de imunofluorescência.

### *Disciplinas de graduação*

1. Grupo de Estudo de Oncologia Molecular. Aula: Células-tronco tumorais de mama. Aula ministrada para alunos do 2º e 3º ano do curso de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Docente Responsável: Prof. Dr. Wagner Ricardo Montor. Atividade: professora convidada
2. Biologia Molecular do Gene (QBQ0126), junto ao curso de graduação em Medicina Veterinária da USP, sob a orientação das Profas. Dra. Mari C. Sogayar e Dra. Daniela S. Basseres. 2010. Atividade: monitoria plena.
3. Biologia Molecular do Gene (QBQ0126), junto ao curso de graduação em Medicina Veterinária da USP, sob a orientação das Profas. Dra. Mari C. Sogayar e Dra. Daniela S. Basseres. 2009. Atividade: monitoria plena.
4. IV Curso de Verão, junto ao departamento de Bioquímica da USP, sob a orientação da Prof. Dr. Bayardo Baptista Torres. 2009. Atividade: aulas teóricas e práticas de Biologia celular e citometria de fluxo.
5. Bioestatística (2005-2006) – Disciplina de graduação ministrada a alunos do curso de Biologia e Biomedicina da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO, junto ao Instituto de Biociências da UNIRIO. Docentes Responsáveis: Profa. Dra. Antonieta D’Alcabtra de Queiroz Perez e Profa. Dra. Maria Tereza Serrano Barbosa. Atividade: monitoria.

## **Orientações e supervisões**

### *Iniciação científica*

1. Carolina Perozzi – Análise de marcadores de células-tronco nas linhagens de câncer de mama. Aluna de Iniciação Científica (Graduanda em Ciências Biológicas) – Agosto de 2009 à Junho de 2011. Universidade de São Paulo. Bolsista: CNPq.
2. Tatiene Romera Garcia – Estabelecimento de um banco de amostras de pacientes portadores de carcinoma mamário. Aluna de Iniciação Científica (Graduanda em Ciências Biológicas) – Julho de 2010 até o presente. Universidade de São Paulo. Bolsista: CNPq.

3. Caio Dalmaso – Modulação da expressão das variantes de splicing do gene supressor de tumor RECK por cd90. Aluno de Iniciação Científica (Graduando em Biomedicina) – Julho de 2012 até o presente. Universidade de São Paulo. Bolsista: CNPq.

## Participação em eventos

---

1. XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2013, Paraná, Brasil.
2. 10th International Congress on Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology (SBBC), 2012, Rio de Janeiro, Brasil
3. II Congresso do Insitituto de Química, 2012, São Paulo, Brasil.
4. 102nd Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2011 (AACR), 2011, Flórida, Estados Unidos. 13th World Congress of IPITA International Pancreas and Islet Transplant Association, 2011. (Congresso). Praga, República Tcheca. Apresentação de painel.
5. VI Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular, 2011, Bahia, Brasil. 2009
6. XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2011, Paraná, Brasil.
7. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) – 1st Latin American Symposium on the Molecular Mechanisms of Skeletal Mineralization, 2010, Paraná, Brasil. 11a Semana Temática da Biologia, 2008. São Paulo, Brasil. Ouvinte.
8. XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2009, São Paulo, Brasil.
9. III Jornada Científica do INCA, 2006, Rio de Janeiro, Brasil

## Apresentação de seminários

---

1. **Lobba, ARM**; Forni MF; Perozzi C; Carreira, ACO; Labriola L; Sogayar, MC. Differentially Expressed Stem Cell Markers in Breast Cancer Cell Lines. VI Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular, 2011, Bahia, Brasil.
2. **Lobba, ARM**; Forni MF; Perozzi C; Carreira, ACO; Sogayar, MC. Differentially Expressed Stem Cell Markers in Breast Cancer Cell Lines. Ciclos de Seminários Temáticos de Controle da Proliferação Celular e Origem de Neoplasias, 2011, São Paulo, Brasil.

## Outros cursos

- 
1. Treinamento de operadora FACS Aria II – BD Biosciences Brasil. Ministrado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. 2011. São Paulo, Brasil



# Differential Expression of CD90 and CD14 Stem Cell Markers in Malignant Breast Cancer Cell Lines

A. R. M. Lobba, M. F. Forni, A. C. O. Carreira, M. C. Sogayar\*

Biochemistry Department, Chemistry Institute, Cell and Molecular Therapy Center (NUCEL), University of São Paulo, 05508-000 São Paulo, Brazil

Received 19 January 2012; Revision Received 19 September 2012; Accepted 21 September 2012

Grant sponsor: Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Grant sponsor: Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP); Grant sponsor: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES); Grant sponsor: Brazilian Ministries of Health (MS-DECIT); Grant sponsor: Science and Technology (MCT).

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

\*Correspondence to: Mari Cleide Sogayar, Chemistry Institute, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, Bloco 9S São Paulo, 05508-000 SP, Brazil

Email: mcsoga@iq.usp.br

Published online 22 October 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/cyto.a.22220

© 2012 International Society for Advancement of Cytometry

## • Abstract

The recently emerged concept of cancer stem cell (CSC) has led to a new hypothesis on the basis for tumor progression. Basically, the CSC theory hypothesizes the presence of a hierarchically organized and relatively rare cell population, which is responsible for tumor initiation, self-renewal, and maintenance, in addition to accumulation of mutation and resistance to chemotherapy. CSCs have recently been described in breast cancer. Different genetic markers have been used to isolate breast CSCs, none of which have been correlated with the tumorigenicity or metastatic potential of the cells, limiting their precise characterization and clinical application in the development of therapeutic protocols. Here, we sought for subpopulations of CSCs by analyzing 10 judiciously chosen stem cell markers in a normal breast cell line (MCF10-A) and in four human breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435, and Hs578-T) displaying different degrees of metastatic and invasiveness potential. We were able to identify two markers, which are differentially expressed in nontumorigenic versus tumor cells. The CD90 marker was highly expressed in the malignant cell lines. Interestingly, the CD14 molecule displayed higher expression levels in the nontumorigenic cell line. Therefore, we demonstrated that these two markers, which are more commonly used to isolate and characterize stem cells, are differentially expressed in breast tumor cells, when compared with nontumorigenic breast cells. © 2012 International Society for Advancement of Cytometry

## • Key terms

CD90; Thy-1; breast cancer; cancer stem cell; CD14; breast cancer stem cell

## INTRODUCTION

Breast cancer is the leading cause of cancer-related death in women worldwide (1,2). In most patients, death is caused by the metastatic disease, which may evolve from the primary tumor. Emerging data suggest that one of the mechanisms accounting for progression of this tumor is the existence of subpopulations of cells present within human cancers, which display stem cell properties. These cells are defined to possess the capacity of self-renewal and differentiation into all of the heterogeneous cancer cells lineages, which comprise the tumor. In particular, cancer cells with stem cell-like properties have been proposed to play a critical role in metastatic progression and tumor resistance to commonly used cancer treatment (3,4).

The current methods for determining whether cell populations isolated from solid tumors are in fact cancer stem cells (CSCs) involve purification of these cells, by cytometric technologies (5), from tumor samples, based on the properties of normal stem cells, namely: the expression of specific cell surface markers. Using this methodology, Al-Hajj et al. (6) identified and isolated breast CSCs using the combined expression of  $CD44^{+}/CD24^{-/low}/lin^{-}$ . This subpopulation of cells is highly enriched for cells, which are able to initiate tumors, can serially propagate tumors in mice (illustrating their capacity of self-renewal) and are resistant to conventional chemotherapy (7).

Although evidence suggests that the  $CD44^{+}/CD24^{-/low}/lin^{-}$  population may represent the breast CSC, recently, some studies have demonstrated that the clinical

## Review Article

# A Review of Stem Cell Translation and Potential Confounds by Cancer Stem Cells

**Bernadette Bibber,<sup>1,2</sup> Garima Sinha,<sup>1,2</sup> Aline R. M. Lobba,<sup>3</sup>  
Steven J. Greco,<sup>2</sup> and Pranela Rameshwar<sup>2,4</sup>**

<sup>1</sup> Rutgers Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Newark, NJ 07103, USA

<sup>2</sup> Department of Medicine-Hematology/Oncology Rutgers, New Jersey Medical School, Newark, NJ 07103, USA

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, University of São Paulo, 05026-000 Sao Paulo, SP, Brazil

<sup>4</sup> New Jersey Medical School, Rutgers School of Biomedical and Health Sciences, 185 South Orange Avenue, MSB, Room E-579, Newark, NJ 07103, USA

Correspondence should be addressed to Pranela Rameshwar; rameshwa@njms.rutgers.edu

Received 24 April 2013; Accepted 5 November 2013

Academic Editor: Kenneth Boheler

Copyright © 2013 Bernadette Bibber et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells found in both fetal and adult tissues. MSCs show promise for cellular therapy for several disorders such as those associated with inflammation. In adults, MSCs primarily reside in the bone marrow (BM) and adipose tissues. In BM, MSCs are found at low frequency around blood vessels and trabecula. MSCs are attractive candidates for regenerative medicine given their ease in harvesting and expansion and their unique ability to bypass the immune system in an allogeneic host. Additionally, MSCs exert pathotropism by their ability to migrate to diseased regions. Despite the “attractive” properties of MSCs, their translation to patients requires indepth research. “Off-the-shelf” MSCs are proposed for use in an allogeneic host. Thus, the transplanted MSCs, when placed in a foreign host, could receive cue from the microenvironment for cellular transformation. An important problem with the use of MSCs involves their ability to facilitate the support of breast and other cancers as carcinoma-associated fibroblasts. MSCs could show distinct effect on each subset of cancer cells. This could lead to untoward effect during MSC therapy since the MSCs would be able to interact with undiagnosed cancer cells, which might be in a dormant state. Based on these arguments, further preclinical research is needed to ensure patient safety with MSC therapy. Here, we discuss the basic biology of MSCs, discuss current applications, and provide evidence why it is important to understand MSC biology in the context of diseased microenvironment for safe application.

## 1. Introduction

Stem cell therapy is not a new field but should be considered as an expanded field to successful bone marrow transplantation for several disorders such as autoimmune diseases and hematological malignancies. Decades of clinical application to reconstitute the hematopoietic system have led to improved methods to increase the age for transplants, resulting in benefit to an aging population [1, 2]. The long history of a focus on hematopoietic stem cells resulted in scientists overlooking other organs with tissue-specific stem cells. This past decade corrected this oversight, resulting in an “explosion” in the number of papers, journals, and

scientific meetings on stem cells. The new focus correlated with an increase in registered stem cell clinical trials ([clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)). Those involved in the educational system across the globe are aware that stem cells are moving rapidly to the clinic while the education of future scientists and practicing physicians lags. This review discusses whether clinical trials with stem cells need a pause while scientists and a team of supporting experts become involved in robust investigational studies. We argue that such delay will ensure that stem cell delivery is done safely.

The field of stem cell provided invaluable information in cancer biology, including insights into cancer stem cells. As scientists begin to understand the latter type of stem cells,

**Supplementary material to the MS “Differential expression of CD90 and CD14 stem cell markers in malignant breast cancer cell lines” by Lobba et al. according to the MIFlowCyt 1.0**

## **Experiment Annotation Using MIFlowCyt Standard**

### **1. Experiment Overview**

#### **1.1. Purpose**

To analyze stem cells markers CD90 and CD14 in human breast cancer cell lines and non-tumorigenic breast cell line seeking for markers that are, in fact, differentially expressed in these cells.

#### **1.2. Keywords**

CD90, Thy-1, breast cancer, cancer stem cell, CD14, breast cancer stem cell

#### **1.3. Experimental Variables**

We analyzed the protein presence of stem cell markers CD90 and CD14 in human breast cancer cell lines: MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435, Hs578-T; and in human non-tumorigenic breast cell line: MDF10-A.

#### **1.4. Organization**

##### **1.4.1. Name**

**1.4.1.1.** University of Sao Paulo, Chemistry Institute, Department of Biochemistry, Molecular and Cellular Therapy Center.

##### **1.4.2. Address**

**1.4.2.1.** Av. Professor Lineu Prestes, 748, sala 964. Cidade Universitária. São Paulo, Brazil. CEP: 05508-000.

#### **1.5. Primary Contact**

**1.5.1. Name:** Mari Cleide Sogayar

**1.5.2. Email:** mcsoga@iq.usp.br

## 1.6. Date

The flow cytometry analyses were performed between February and June 2011.

## 1.7. Conclusions

We found that the CD90 marker was highly expressed in the malignant cells lines, while the CD14 marker displayed higher expression levels in the normal cell line.

## 1.8. Quality Control Measures

Single stained controls were included. Voltages were adjusted such that fluorescence intensity was identical for each antibody, regardless of acquisition date. Calibrations beads (Beads; BD catalog no. 642412. Lote no. 80484).

## 2. Flow Sample/Specimen Description

### 2.1. Biological Sample Description

Non-tumorigenic human breast cell line: MCF10-A

Human breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435, Hs578-T

### 2.2. Environmental Samples

Not applicable.

### 2.3. Sample Characteristics

#### Features of cell lines

Cell Line	ER	PR	Source	Histologic type	Invasive potential	Metastatic potential
MCF-10	-	-	P.Br	F	-	-
MCF-7	+	+	PE	IDC	+	-
MDA-MB-231	-	-	PE	AC	++++	+
MDA-MB-435	-	-	PE	IDC	+++	++++
Hs578-T	-	-	P.Br	IDC	++++	++++

AC, adenocarcinoma; F, fibrocystic disease; IDC, invasive ductal carcinoma; P.Br, primary breast; PE, pleural effusion; ER/PR/ status: ER/PR positivity. (Neve RM, Chin K, Fridlyand J, et

al. Collection of breast cancer cell lines for studying the functionality of distinct cancer subtypes. (Cancer Cell 2006;10:515–27)

## 2.4 Sample Treatment Description

Not applicable.

## 2.5 Fluorescence Reagent Description

	Characteristic Measured	Being	Antibody Name	Clone Name	Vendor Cat N°	Dilution Used
<b>Blue</b>						
<b>FITC</b>	Cell Surface Protein		CD90/Thy-1	F15-42-1	abcam ab11155	1:200
<b>FITC</b>	Cell Surface Protein		IgG1- k isotype control	MOPC-31C	BD 555748	1:200
<b>PE</b>	Cell Surface Protein		IgG2a - k isotype control	G155-178	BD 555574	1:200
<b>PE/Cy5.5</b>	Cell Surface Protein		CD14	61D3	abcam ab25390	1:400

	Characteristic Measured	Being	Antibody Name	Clone Name	Vendor Cat N°	Dilution Used
<b>Red</b>						
<b>APC</b>	Cell Surface Protein		CD44	G44-26	BD Pharmingen 559942	1:200

## 3. Instrument Details

### 3.1 Instrument Manufacturer

BD FACSAria I Special Order

BD FACSDiva Software v5.0.3

[wwwbdbiosciences.com](http://wwwbdbiosciences.com)

### 3.2 Instrument Configuration and Settings

Detector voltages listed below are from the data analysis from one of the three experiments, with little to no changes being made between them; see section 1.8 for how voltages were adjusted Biosciences; instrument details that are not specifically mentioned here have not been altered after purchase from the manufacturer (BD). The lasers are listed in the order the cells pass through them, with height, width and area detected as parameter values. The detectors and filters are listed in the order the light hits them with the exception of the FSC. PMT = photomultiplier tube; PD = photodiode; BP = band-pass filter where the first number is the wavelength of the center of the interval, and the second number is the width of the interval; LP = long-pass filter; n.a. = not applicable. LP filters are dichroic, and reflect at an angle of incidence of 11.25°.

<b>Laser</b>	<b>Detector name (type)</b>	<b>Filter 1 (1st filter)</b>	<b>Filter 2 (2nd filter)</b>	<b>Parameter detected</b>	<b>Channel voltage (mV)</b>	<b>Amplification type</b>
<b>Blue laser (488 nm)</b> Solid-state Coherent Sapphire <sup>TM</sup> Solid 20 mW	FSC (PD)	488/10 BP	n.a.	FSC	11	Log
	488 A (PMT)	735 LP	780/60 BP	PE-Cy7	n.a.	Log
	488 B (PMT)	655 LP	695/40 BP	PerCP-Cy5.5	511	Log
	488 C (PMT)	595 LP	610/20 BP	PE-Texas-Red	n.a.	Log
	488 D (PMT)	556 LP	572/26 BP	PE	n.a.	Log
	488 E (PMT)	502 LP	530/30BP	FITC	397	Log
	488 F (PMT)	blank	n.a	SSC	198	Log
<b>UV laser (355 nm)</b> Solid state	355 A (PMT)	502 LP	530/30 BP	Alexa fluor	n.a.	Linear

Coherent Lightwave Xcyte 20 mW	355 B (PMT)	blank	440/40 BP	DAPI	n.a.	Linear
Red laser (633 nm) JSD Uniphase <sup>TM</sup> HeNe Cooled Power 30mW	637 A (PMT)	735 LP	780/60 BP	APC-Cy7	n.a.	Linear
	637 B (PMT)	blank	660/20 BP	APC	453	Log

### 3.3 Other Relevant Instrument Details

#### 3.3.1 Threshold

On FCS 5000

#### 3.3.2 Nozzle

100 micrometer

#### 3.3.3 Events rate/number of events

Average of 1000-2000/sec

## 4. Data Analysis Details

### 4.1 List-mode Data Files

First Experiment

Name	Statistic	#Cells
10_05_2011_Hs578T CD14,2f,CD90_001.fcs		50000
Celulas	60.7	30364
FITC-A+	95.5	28985
FITC-A-	4.54	1379
PerCP-Cy5-5-A+	30.6	9285
PerCP-Cy5-5-A-	69.4	21079
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	72	21864
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	9.19	2791
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.198	60
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	18.6	5649
10_05_2011_Hs578T CD14,2f,CD90.fcs		50000
Celulas	67.9	33943
FITC-A+	95.3	32350
FITC-A-	4.69	1593

PerCP-Cy5-5-A+	48.5	16456
PerCP-Cy5-5-A-	51.5	17487
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	62.9	21340
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	17.9	6062
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.943	320
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	18.3	6221
Three-D View		
10_05_2011_Hs578T CD14_001.fcs		50000
Celulas	64.8	32413
PerCP-Cy5-5-A+	20	6471
PerCP-Cy5-5-A-	80	25942
10_05_2011_Hs578T CD14.fcs		50000
Celulas	65.2	32578
PerCP-Cy5-5-A+	28.9	9411
PerCP-Cy5-5-A-	71.1	23167
10_05_2011_Hs578T CD90_001.fcs		50000
Celulas	75.9	37950
FITC-A+	86.8	32929
FITC-A-	13.2	5021
10_05_2011_Hs578T CD90.fcs		50000
Celulas	77.4	38685
FITC-A+	90.7	35081
FITC-A-	9.32	3604
10_05_2011_Hs578T Controle.fcs		50000
Celulas	74.8	37401
FITC-A+	4.57	1708
FITC-A-	95.4	35693
PerCP-Cy5-5-A+	3.97	1483
PerCP-Cy5-5-A-	96	35918
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.027	10
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	1.29	482
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.297	111
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	98.4	36798
10_05_2011_Hs578T Controle_001.fcs		50000
Celulas	72.3	36135
FITC-A+	5.7	2058
FITC-A-	94.3	34077
PerCP-Cy5-5-A+	5.07	1832
PerCP-Cy5-5-A-	94.9	34303
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.053	19
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	1.4	505
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.382	138
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	98.2	35473
10_05_2011_Hs578T IGg1.fcs		50000
Celulas	69	34489
FITC-A+	5.13	1769
FITC-A-	94.9	32720
10_05_2011_Hs578T IGg2A.fcs		50000
Celulas	57.6	28805
PerCP-Cy5-5-A+	3.41	981
PerCP-Cy5-5-A-	96.6	27824

10_05_2011_MCF7 IGg2A.fcs		50000
celulas	80.5	40269
PerCP-Cy5-5-A+	1.25	504
PerCP-Cy5-5-A-	98.7	39765
10_05_2011_MCF7 CD14,2f,CD90_001.fcs		50000
celulas	84.6	42292
FITC-A+	9.1	3849
FITC-A-	90.9	38443
PerCP-Cy5-5-A+	15.6	6583
PerCP-Cy5-5-A-	84.4	35709
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.22	93
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	3.94	1665
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	4.3	1817
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	91.5	38717
10_05_2011_MCF7 CD14,2f,CD90.fcs		50000
celulas	80.6	40291
FITC-A+	7.25	2921
FITC-A-	92.8	37370
PerCP-Cy5-5-A+	14	5622
PerCP-Cy5-5-A-	86	34669
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.184	74
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	2.88	1162
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	4.28	1723
10_05_2011_MCF7 CD14_001.fcs		50000
celulas	82.9	41444
PerCP-Cy5-5-A+	5.11	2117
PerCP-Cy5-5-A-	94.9	39327
10_05_2011_MCF7 CD14.fcs		50000
celulas	69.7	34864
PerCP-Cy5-5-A+	5.45	1900
PerCP-Cy5-5-A-	94.6	32964
10_05_2011_MCF7 CD90_001.fcs		50000
celulas	85.9	42926
FITC-A+	7.63	3276
FITC-A-	92.4	39650
10_05_2011_MCF7 CD90.fcs		50000
celulas	84	42000
FITC-A+	9.65	4053
FITC-A-	90.4	37947
10_05_2011_MCF7 Controle.fcs		50000
celulas	81.2	40575
FITC-A+	3.09	1253
FITC-A-	96.9	39322
PerCP-Cy5-5-A+	1.54	626
PerCP-Cy5-5-A-	98.5	39949
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.712	289
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.525	213
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.022	9
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	98.7	40064
10_05_2011_MCF7 Controle_001.fcs		50000

celulas	82.2	41117
FITC-A+	3.52	1449
FITC-A-	96.5	39668
PerCP-Cy5-5-A+	1.48	609
PerCP-Cy5-5-A-	98.5	40508
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.9	370
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.54	222
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.017	7
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	98.5	40518
10_05_2011_MCF7 IGg1.fcs		50000
celulas	79.7	39833
FITC-A+	3	1193
FITC-A-	97	38640
10_05_2011_MCF10A CD14,2f,CD90_001.fcs		50000
Celulas	74.9	37433
FITC-A+	3.99	1492
FITC-A-	96	35941
PerCP-Cy5-5-A+	68.3	25549
PerCP-Cy5-5-A-	31.7	11884
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.005	2
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.93	348
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	25.4	9495
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	73.7	27588
10_05_2011_MCF10A CD14,2f,CD90.fcs		50000
Celulas	76.3	38173
FITC-A+	3.19	1216
FITC-A-	96.8	36957
PerCP-Cy5-5-A+	64.8	24751
PerCP-Cy5-5-A-	35.2	13422
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0	0
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.705	269
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	22.1	8424
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	77.2	29480
10_05_2011_MCF10A CD14_001.fcs		50000
Celulas	75.1	37563
PerCP-Cy5-5-A+	56.8	21327
PerCP-Cy5-5-A-	43.2	16236
10_05_2011_MCF10A CD14.fcs		50000
Celulas	74.4	37187
PerCP-Cy5-5-A+	54.6	20319
PerCP-Cy5-5-A-	45.4	16868
10_05_2011_MCF10A CD90_001.fcs		40340
Celulas	68.3	27561
FITC-A+	2.02	556
FITC-A-	98	27005
10_05_2011_MCF10A CD90.fcs		50000
Celulas	74.8	37418
FITC-A+	4.24	1588
FITC-A-	95.8	35830
10_05_2011_MCF10A Controle.fcs		50000

Celulas	69.2	34587
FITC-A+	1.7	589
FITC-A-	98.3	33998
PerCP-Cy5-5-A+	16.5	5693
PerCP-Cy5-5-A-	83.5	28894
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.012	4
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.254	88
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	1.04	358
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	98.7	34137
10_05_2011_MCF10A Controle_001.fcs		50000
Celulas	75.2	37586
FITC-A+	1.12	422
FITC-A-	98.9	37164
PerCP-Cy5-5-A+	5.03	1891
PerCP-Cy5-5-A-	95	35695
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.037	14
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.144	54
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.088	33
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	99.7	37485
10_05_2011_MCF10A IGg1.fcs		50000
Celulas	75	37525
FITC-A+	1.88	704
FITC-A-	98.1	36821
10_05_2011_MCF10A IGg2A.fcs		50000
Celulas	71.8	35897
PerCP-Cy5-5-A+	5.02	1802
PerCP-Cy5-5-A-	95	34095
10_05_2011_231_CD14,2f,CD90_001.fcs		50000
Celulas	88.3	44173
FITC-A+	1.58	699
FITC-A-	98.4	43474
PerCP-Cy5-5-A+	8.66	3824
PerCP-Cy5-5-A-	91.3	40349
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.005	2
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.589	260
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	2.66	1175
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	96.7	42736
10_05_2011_231_CD14,2f,CD90.fcs		50000
Celulas	89.7	44845
FITC-A+	2.48	1113
FITC-A-	97.5	43732
PerCP-Cy5-5-A+	16.6	7428
PerCP-Cy5-5-A-	83.4	37417
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.009	4
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.836	375
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	5.45	2442
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	93.7	42024
10_05_2011_231_CD14_001.fcs		50000
Celulas	89.5	44743
PerCP-Cy5-5-A+	19.8	8866
PerCP-Cy5-5-A-	80.2	35877

10_05_2011_231_CD14.fcs		50000
Celulas	88.6	44283
PerCP-Cy5-5-A+	14	6201
PerCP-Cy5-5-A-	86	38082
10_05_2011_231_CD90_001.fcs		50000
Celulas	90.8	45423
FITC-A+	2.79	1266
FITC-A-	97.2	44157
10_05_2011_231_CD90.fcs		50000
Celulas	87.9	43945
FITC-A+	2.88	1264
FITC-A-	97.1	42681
10_05_2011_231_IGg1.fcs		50000
Celulas	87.5	43727
FITC-A+	1.69	739
FITC-A-	98.3	42988
10_05_2011_231_IGg2A.fcs		50000
Celulas	85.4	42691
PerCP-Cy5-5-A+	1.6	685
PerCP-Cy5-5-A-	98.4	42006
10_05_2011_231_Controle.fcs		50000
Celulas	83.8	41891
FITC-A+	1.1	461
FITC-A-	98.9	41430
PerCP-Cy5-5-A+	1.93	808
PerCP-Cy5-5-A-	98.1	41083
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.024	10
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.212	89
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.119	50
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	99.6	41742
10_05_2011_231_Controle_001.fcs		50000
Celulas	81.2	40591
FITC-A+	1.01	410
FITC-A-	99	40181
PerCP-Cy5-5-A+	1.86	755
PerCP-Cy5-5-A-	98.1	39836
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.012	5
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.192	78
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.111	45
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	99.7	40463
10_05_2011_435_CD14,2f,CD90_001.fcs		50000
Celulas	79.8	39900
FITC-A+	14.8	5888
FITC-A-	85.2	34012
PerCP-Cy5-5-A+	24.6	9802
PerCP-Cy5-5-A-	75.4	30098
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	2.53	1008
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	1.49	594
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	1.9	760
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	94.1	37538
10_05_2011_435_CD14,2f,CD90.fcs		50000

Celulas	82.8	41406
FITC-A+	13.7	5679
FITC-A-	86.3	35727
PerCP-Cy5-5-A+	19.5	8058
PerCP-Cy5-5-A-	80.5	33348
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	2.64	1094
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	1.31	544
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	1.72	712
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	94.3	39056
10_05_2011_435 CD14__001.fcs		50000
Celulas	81.5	40742
PerCP-Cy5-5-A+	11.6	4712
PerCP-Cy5-5-A-	88.4	36030
10_05_2011_435 CD14.fcs		50000
Celulas	93.8	46918
PerCP-Cy5-5-A+	55.5	26026
PerCP-Cy5-5-A-	44.5	20892
10_05_2011_435 CD90_001.fcs		50000
Celulas	89.6	44820
FITC-A+	13.7	6120
FITC-A-	86.3	38700
10_05_2011_435 CD90.fcs		50000
Celulas	84.7	42349
FITC-A+	69.9	29593
FITC-A-	30.1	12756
10_05_2011_435 Controle_001.fcs		50000
Celulas	89.9	44927
FITC-A+	6.16	2766
FITC-A-	93.8	42161
PE-A+	1.11	500
PE-A-	98.9	44427
PerCP-Cy5-5-A+	6.91	3106
PerCP-Cy5-5-A-	93.1	41821
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.098	44
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.227	102
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.033	15
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	99.6	44766
10_05_2011_435 IGg1.fcs		50000
Celulas	96.1	48048
FITC-A+	1.89	908
FITC-A-	98.1	47140
10_05_2011_435 IGg2A.fcs		50000
Celulas	90.6	45278
PE-A+	1.01	458
PE-A-	99	44820
PerCP-Cy5-5-A+	8.89	4023
PerCP-Cy5-5-A-	91.1	41255
10_05_2011_435 Controle.fcs		50000
Celulas	82.1	41063
FITC-A+	6.89	2829
FITC-A-	93.1	38234

PerCP-Cy5-5-A+	5.3	2177
PerCP-Cy5-5-A-	94.7	38886
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.127	52
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.236	97
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.063	26
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	99.6	40888

Second Experiment:

Name	Statistic	#Cells
17_05_2011_Hs576 IgG2.fcs		50000
Celulas	84.2	42077
PerCP-Cy5-5-A+	8.59	3615
PerCP-Cy5-5-A-	91.4	38462
17_05_2011_Hs576 CD14,2f,CD90_001.fcs		50000
Celulas	89.2	44597
FITC-A+	86.6	38643
FITC-A-	13.4	5954
PerCP-Cy5-5-A+	35.7	15900
PerCP-Cy5-5-A-	64.3	28697
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	46.7	20845
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	15.7	7000
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.751	335
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	36.8	16417
17_05_2011_Hs576 CD14,2f,CD90.fcs		50000
Celulas	87.1	43572
FITC-A+	86.2	37561
FITC-A-	13.8	6011
PerCP-Cy5-5-A+	34.3	14937
PerCP-Cy5-5-A-	65.7	28635
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	46.1	20099
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	15.2	6636
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.721	314
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	37.9	16523
17_05_2011_Hs576 CD14_001.fcs		50000
Celulas	87.7	43863
PerCP-Cy5-5-A+	26.4	11586
PerCP-Cy5-5-A-	73.6	32277
17_05_2011_Hs576 CD14.fcs		50000
Celulas	90.1	45031
PerCP-Cy5-5-A+	26.6	11985
PerCP-Cy5-5-A-	73.4	33046
17_05_2011_Hs576 CD90_001.fcs		50000
Celulas	88.6	44286
FITC-A+	83.2	36838
FITC-A-	16.8	7448
17_05_2011_Hs576 CD90.fcs		50000
Celulas	87.9	43927
FITC-A+	81	35589
FITC-A-	19	8338

17_05_2011_Hs576 Controle.fcs		50000
Celulas	88	44019
FITC-A+	8.44	3717
FITC-A-	91.6	40302
PerCP-Cy5-5-A+	7.3	3215
PerCP-Cy5-5-A-	92.7	40804
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.404	178
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	2.84	1251
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.17	75
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	96.6	42515
17_05_2011_Hs576 Controle_001.fcs		50000
Celulas	87.8	43876
FITC-A+	7.72	3388
FITC-A-	92.3	40488
PerCP-Cy5-5-A+	10.7	4686
PerCP-Cy5-5-A-	89.3	39190
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.096	42
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	2.93	1286
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	1.32	578
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	95.7	41970
17_05_2011_Hs576 IgG1.fcs		50000
Celulas	89.9	44934
FITC-A+	9.33	4193
FITC-A-	90.7	40741
17_05_2011_MBMDA231 IgG2.fcs		50000
Celulas	96.2	48123
PerCP-Cy5-5-A+	4.1	1971
PerCP-Cy5-5-A-	95.9	46152
17_05_2011_MBMDA231 CD14,2f,CD90_001.fcs		50000
Celulas	97	48503
FITC-A+	5.53	2684
FITC-A-	94.5	45819
PerCP-Cy5-5-A+	14.9	7235
PerCP-Cy5-5-A-	85.1	41268
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.148	72
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.711	345
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.903	438
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	98.2	47648
17_05_2011_MBMDA231 CD14,2f,CD90.fcs		50000
Celulas	96.5	48263
FITC-A+	5.17	2493
FITC-A-	94.8	45770
PerCP-Cy5-5-A+	13	6286
PerCP-Cy5-5-A-	87	41977
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.201	97
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.69	333
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.736	355
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	98.4	47478
17_05_2011_MBMDA231 CD14_001.fcs		50000
Celulas	96.7	48345
PerCP-Cy5-5-A+	10.5	5091

PerCP-Cy5-5-A-	89.5	43254
17_05_2011_MBMDA231 CD14.fcs		50000
Celulas	96.8	48403
PerCP-Cy5-5-A+	12.7	6157
PerCP-Cy5-5-A-	87.3	42246
17_05_2011_MBMDA231 CD90_001.fcs		50000
Celulas	96.4	48203
FITC-A+	4.77	2297
FITC-A-	95.2	45906
17_05_2011_MBMDA231 CD90.fcs		50000
Celulas	96.3	48139
FITC-A+	4.45	2143
FITC-A-	95.5	45996
17_05_2011_MBMDA231 Controle.fcs		50000
Celulas	95.8	47921
FITC-A+	3.87	1853
FITC-A-	96.1	46068
PerCP-Cy5-5-A+	3.72	1785
PerCP-Cy5-5-A-	96.3	46136
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.417	200
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.227	109
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.002	1
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	99.4	47611
17_05_2011_MBMDA231 Controle_001.fcs		50000
Celulas	96.8	48381
FITC-A+	4.6	2225
FITC-A-	95.4	46156
PerCP-Cy5-5-A+	3.77	1822
PerCP-Cy5-5-A-	96.2	46559
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.548	265
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.192	93
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.004	2
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	99.3	48021
17_05_2011_MBMDA231 IgG1.fcs		50000
Celulas	96.7	48370
FITC-A+	4.19	2028
FITC-A-	95.8	46342
17_05_2011_MBMDA435 IgG2.fcs		50000
Celulas	98.9	49461
PerCP-Cy5-5-A+	2.54	1258
PerCP-Cy5-5-A-	97.5	48203
17_05_2011_MBMDA435 CD14,2f,CD90_001.fcs		50000
Celulas	99	49478
FITC-A+	5.53	2737
FITC-A-	94.5	46741
PerCP-Cy5-5-A+	12.7	6262
PerCP-Cy5-5-A-	87.3	43216
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.02	10
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	1.07	529
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	1.75	868
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	97.2	48071

17_05_2011_MBMDA435 CD14,2f,CD90.fcs		50000
Celulas	98.7	49346
FITC-A+	5.26	2595
FITC-A-	94.7	46751
PerCP-Cy5-5-A+	21.9	10802
PerCP-Cy5-5-A-	78.1	38544
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.014	7
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	1.12	551
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	4.64	2290
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	94.2	46498
17_05_2011_MBMDA435 CD14_001.fcs		50000
Celulas	98.8	49419
PerCP-Cy5-5-A+	13.2	6518
PerCP-Cy5-5-A-	86.8	42901
17_05_2011_MBMDA435 CD14.fcs		50000
Celulas	99	49517
PerCP-Cy5-5-A+	3.99	1974
PerCP-Cy5-5-A-	96	47543
17_05_2011_MBMDA435 CD90_001.fcs		50000
Celulas	98.9	49440
FITC-A+	5.19	2564
FITC-A-	94.8	46876
17_05_2011_MBMDA435 CD90.fcs		50000
Celulas	99	49506
FITC-A+	5.88	2913
FITC-A-	94.1	46593
17_05_2011_MBMDA435 Controle.fcs		50000
Celulas	99	49494
FITC-A+	4.35	2154
FITC-A-	95.6	47340
PerCP-Cy5-5-A+	2.51	1243
PerCP-Cy5-5-A-	97.5	48251
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.166	82
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.802	397
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.154	76
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	98.9	48939
17_05_2011_MBMDA435 Controle_001.fcs		50000
Celulas	98.9	49434
FITC-A+	4.49	2219
FITC-A-	95.5	47215
PerCP-Cy5-5-A+	3.07	1519
PerCP-Cy5-5-A-	96.9	47915
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.125	62
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.84	415
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.218	108
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	98.8	48849
17_05_2011_MBMDA435 IgG1.fcs		50000
Celulas	98.7	49372
FITC-A+	4.39	2168
FITC-A-	95.6	47204
17_05_2011_MCF7 CD14,2f,CD90_001.fcs		30000

Celulas	79.4	23829
FITC-A+	15.1	3600
FITC-A-	84.9	20229
PerCP-Cy5-5-A+	28.7	6834
PerCP-Cy5-5-A-	71.3	16995
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.298	71
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	18.1	4314
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	16.1	3838
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	65.5	15606
17_05_2011_MCF7 CD14,2f,CD90.fcs		30000
Celulas	77.9	23374
FITC-A+	13	3039
FITC-A-	87	20335
PerCP-Cy5-5-A+	22.4	5228
PerCP-Cy5-5-A-	77.6	18146
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.59	138
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	15.1	3541
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	12.7	2957
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	71.6	16738
17_05_2011_MCF7 CD14_001.fcs		30000
Celulas	79.9	23957
PerCP-Cy5-5-A+	23.4	5599
PerCP-Cy5-5-A-	76.6	18358
17_05_2011_MCF7 CD14.fcs		30000
Celulas	77.6	23274
PerCP-Cy5-5-A+	20.6	4804
PerCP-Cy5-5-A-	79.4	18470
17_05_2011_MCF7 CD90_001.fcs		30000
Celulas	74.8	22440
FITC-A+	11.1	2480
FITC-A-	88.9	19960
17_05_2011_MCF7 CD90.fcs		30000
Celulas	74.3	22293
FITC-A+	11.8	2639
FITC-A-	88.2	19654
17_05_2011_MCF7 Controle.fcs		14935
Celulas	67.8	10128
FITC-A+	3.25	329
FITC-A-	96.8	9799
PerCP-Cy5-5-A+	3.17	321
PerCP-Cy5-5-A-	96.8	9807
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.523	53
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	3.69	374
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.681	69
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	95.1	9632
17_05_2011_MCF7 Controle_001.fcs		35597
Celulas	70.3	25032
FITC-A+	6.34	1587
FITC-A-	93.7	23445
PerCP-Cy5-5-A+	1.75	439
PerCP-Cy5-5-A-	98.2	24593

Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	5.31	1329
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	2.6	652
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.032	8
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	92.1	23043
17_05_2011_MCF7 IgG1.fcs		30000
Celulas	79.1	23716
FITC-A+	9.89	2346
FITC-A-	90.1	21370
17_05_2011_MCF7 IgG2.fcs		30000
Celulas	74	22201
PerCP-Cy5-5-A+	1.82	403
PerCP-Cy5-5-A-	98.2	21798
17_05_2011_MCF10A CD14,2f,CD90_001.fcs		50000
Celulas	97.4	48721
FITC-A+	2.53	1232
FITC-A-	97.5	47489
PerCP-Cy5-5-A+	63.1	30722
PerCP-Cy5-5-A-	36.9	17999
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.259	126
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	1.78	867
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	5.73	2794
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	92.2	44934
17_05_2011_MCF10A CD14,2f,CD90.fcs		50000
Celulas	96.7	48356
FITC-A+	2.47	1195
FITC-A-	97.5	47161
PerCP-Cy5-5-A+	61.5	29738
PerCP-Cy5-5-A-	38.5	18618
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.242	117
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	1.75	846
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	5.41	2616
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	92.6	44777
17_05_2011_MCF10A CD14_001.fcs		50000
Celulas	97	48488
PerCP-Cy5-5-A+	7.06	3423
PerCP-Cy5-5-A-	92.9	45065
17_05_2011_MCF10A CD14.fcs		50000
Celulas	96.4	48212
PerCP-Cy5-5-A+	7.9	3808
PerCP-Cy5-5-A-	92.1	44404
17_05_2011_MCF10A CD90_001.fcs		50000
Celulas	97.5	48737
FITC-A+	2.02	983
FITC-A-	98	47754
17_05_2011_MCF10A CD90.fcs		50000
Celulas	97.1	48537
FITC-A+	2.03	985
FITC-A-	98	47552
17_05_2011_MCF10A Controle.fcs		50000
Celulas	96.9	48471
FITC-A+	1.13	547

FITC-A-	98.9	47924
PerCP-Cy5-5-A+	1.52	738
PerCP-Cy5-5-A-	98.5	47733
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.512	248
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.386	187
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.39	189
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	98.7	47847
17_05_2011_MCF10A Controle_001.fcs		50000
Celulas	96.6	48280
FITC-A+	1.08	521
FITC-A-	98.9	47759
PerCP-Cy5-5-A+	0.71	343
PerCP-Cy5-5-A-	99.3	47937
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.549	265
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.354	171
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.05	24
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	99	47820
17_05_2011_MCF10A IgG1.fcs		50000
Celulas	97.5	48755
FITC-A+	1.36	663
FITC-A-	98.6	48092
17_05_2011_MCF10A IgG2.fcs		50000
Celulas	96.4	48209
PerCP-Cy5-5-A+	11.9	5736
PerCP-Cy5-5-A-	88.1	42473

Third Experiment:

Name	Statistic	#Cells
22_05_2011_Hs578 CD14,2f,CD90_001.fcs		50000
Celulas	82.7	41368
FITC-A+	96.2	39801
FITC-A-	3.79	1567
PerCP-Cy5-5-A+	22	9104
PerCP-Cy5-5-A-	78	32264
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	69.4	28714
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	6.46	2671
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.104	43
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	24	9940
22_05_2011_Hs578 CD14,2f,CD90.fcs		50000
Celulas	89	44504
FITC-A+	96.5	42958
FITC-A-	3.47	1546
PerCP-Cy5-5-A+	21.6	9598
PerCP-Cy5-5-A-	78.4	34906
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	70.3	31303
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	4.39	1955
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.027	12
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	25.2	11234

22_05_2011_Hs578 CD14_001.fcs		50000
Celulas	90.2	45078
PerCP-Cy5-5-A+	14.8	6668
PerCP-Cy5-5-A-	85.2	38410
22_05_2011_Hs578 CD14.fcs		50000
Celulas	89.1	44538
PerCP-Cy5-5-A+	14.3	6385
PerCP-Cy5-5-A-	85.7	38153
22_05_2011_Hs578 CD90_001.fcs		50000
Celulas	87.6	43779
FITC-A+	94.8	41521
FITC-A-	5.16	2258
22_05_2011_Hs578 CD90.fcs		50000
Celulas	85.8	42913
FITC-A+	95.1	40794
FITC-A-	4.94	2119
22_05_2011_Hs578 IgG1.fcs		50000
Celulas	88.7	44364
FITC-A+	4.73	2097
FITC-A-	95.3	42267
22_05_2011_Hs578 IgG2.fcs		50000
Celulas	89.8	44909
PE-A+	1.1	496
PE-A-	98.9	44413
22_05_2011_Hs578 controle.fcs		50000
Celulas	87.5	43726
FITC-A+	5.62	2458
FITC-A-	94.4	41268
PE-A+	0.805	352
PE-A-	99.2	43374
PerCP-Cy5-5-A+	4.56	1994
PerCP-Cy5-5-A-	95.4	41732
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.075	33
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.59	258
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.114	50
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	99.2	43385
22_05_2011_Hs578 controle_001.fcs		50000
Celulas	88.3	44159
FITC-A+	5.78	2553
FITC-A-	94.2	41606
PerCP-Cy5-5-A+	4.75	2097
PerCP-Cy5-5-A-	95.3	42062
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.104	46
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.969	428
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.211	93
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	98.7	43592
22_05_2011_MCF7 CD14,2f,CD90_001.fcs		50000
Celulas	95.6	47776
FITC-A+	8.6	4109
FITC-A-	91.4	43667

PerCP-Cy5-5-A+	7.72	3688
PerCP-Cy5-5-A-	92.3	44088
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.597	285
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	3.86	1846
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.741	354
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	94.8	45291
22_05_2011_MCF7 CD14,2f,CD90.fcs		50000
Celulas	95.4	47725
FITC-A+	11	5258
FITC-A-	89	42467
PerCP-Cy5-5-A+	10.2	4875
PerCP-Cy5-5-A-	89.8	42850
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.71	339
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	100	47725
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	1.02	489
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	92.9	44333
22_05_2011_MCF7 CD14_001.fcs		50000
Celulas	95.5	47764
PerCP-Cy5-5-A+	8.28	3957
PerCP-Cy5-5-A-	91.7	43807
22_05_2011_MCF7 CD14.fcs		50000
Celulas	96.1	48033
PerCP-Cy5-5-A+	11.2	5390
PerCP-Cy5-5-A-	88.8	42643
22_05_2011_MCF7 CD90_001.fcs		50000
Celulas	95.8	47902
FITC-A+	9.55	4576
FITC-A-	90.4	43326
22_05_2011_MCF7 CD90.fcs		50000
Celulas	95.8	47917
FITC-A+	9.04	4330
FITC-A-	91	43587
22_05_2011_MCF7 IgG1.fcs		50000
Celulas	96.3	48143
FITC-A+	7.1	3419
FITC-A-	92.9	44724
22_05_2011_MCF7 IgG2.fcs		50000
Celulas	95.6	47790
PE-A+	0.287	137
PE-A-	99.7	47653
22_05_2011_MCF7 controle.fcs		50000
Celulas	93.2	46576
FITC-A+	2.47	1152
FITC-A-	97.5	45424
PE-A+	0.29	135
PE-A-	99.7	46441
PerCP-Cy5-5-A+	1.6	746
PerCP-Cy5-5-A-	98.4	45830
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.404	188
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.769	358
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.036	17

Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	98.8	46013
22_05_2011_MCF7 controle_001.fcs		50000
Celulas	95.7	47874
FITC-A+	2.61	1250
FITC-A-	97.4	46624
PerCP-Cy5-5-A+	1.45	695
PerCP-Cy5-5-A-	98.5	47179
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.161	77
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	12.7	6068
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	2.11	1008
22_05_2011_MCF10A CD14,2f,CD90_001.fcs		50000
Celulas	97.4	48677
PerCP-Cy5-5-A+	75.5	36774
PerCP-Cy5-5-A-	24.5	11903
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0	0
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	100	48677
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	28.4	13827
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	67.7	32951
22_05_2011_MCF10A CD14,2f,CD90.fcs		50000
Celulas	96.2	48121
PerCP-Cy5-5-A+	69.9	33620
PerCP-Cy5-5-A-	30.1	14501
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0	0
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	3.38	1625
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	24.3	11705
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	72.3	34791
22_05_2011_MCF10A CD14_001.fcs		50000
Celulas	95.8	47884
PerCP-Cy5-5-A+	61.5	29471
PerCP-Cy5-5-A-	38.5	18413
22_05_2011_MCF10A CD14.fcs		50000
Celulas	97.4	48706
PerCP-Cy5-5-A+	65.8	32048
PerCP-Cy5-5-A-	34.2	16658
22_05_2011_MCF10A CD90_001.fcs		50000
Celulas	90.5	45265
FITC-A+	5.87	2659
FITC-A-	94.1	42606
22_05_2011_MCF10A CD90.fcs		50000
Celulas	94.3	47133
FITC-A+	6.55	3085
FITC-A-	93.5	44048
22_05_2011_MCF10A IgG1.fcs		50000
Celulas	97.7	48861
FITC-A+	1.33	649
FITC-A-	98.7	48212
22_05_2011_MCF10A IgG2.fcs		50000
Celulas	97.9	48969
PE-A+	0.317	155
PE-A-	99.7	48814

22_05_2011_MCF10A controle.fcs		50000
22_05_2011_MCF10A controle_001.fcs		50000
Celulas	96.7	48363
FITC-A+	1.7	823
FITC-A-	98.3	47540
PerCP-Cy5-5-A+	5.2	2517
PerCP-Cy5-5-A-	94.8	45846
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.306	148
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.544	263
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.039	19
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	99.1	47933
22_05_2011_231_CD14,2f,CD90_001.fcs		50000
Celulas	97	48490
FITC-A+	12.9	6252
FITC-A-	87.1	42238
PerCP-Cy5-5-A+	33.3	16161
PerCP-Cy5-5-A-	66.7	32329
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.025	12
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	2.35	1138
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	10.9	5309
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	86.7	42031
22_05_2011_231_CD14,2f,CD90.fcs		50000
Celulas	95	47499
FITC-A+	13.3	6297
FITC-A-	86.7	41202
PerCP-Cy5-5-A+	29.7	14097
PerCP-Cy5-5-A-	70.3	33402
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.046	22
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	2.44	1157
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	9.28	4407
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	88.2	41913
22_05_2011_231_CD14_001.fcs		50000
Celulas	96.5	48236
PerCP-Cy5-5-A+	26.9	12967
PerCP-Cy5-5-A-	73.1	35269
22_05_2011_231_CD14.fcs		50000
Celulas	95.8	47902
PerCP-Cy5-5-A+	25.7	12332
PerCP-Cy5-5-A-	74.3	35570
22_05_2011_231_CD90_001.fcs		50000
Celulas	95.9	47961
FITC-A+	12.8	6153
FITC-A-	87.2	41808
22_05_2011_231_CD90.fcs		50000
Celulas	95.7	47851
FITC-A+	12.2	5844
FITC-A-	87.8	42007
22_05_2011_231_IgG1.fcs		50000
Celulas	95.8	47902
FITC-A+	5.29	2533
FITC-A-	94.7	45369

22_05_2011_231 IgG2.fcs		50000
Celulas	95.3	47660
PE-A+	0.365	174
PE-A-	99.6	47486
22_05_2011_231 controle.fcs		50000
Celulas	96.2	48098
FITC-A+	5.05	2430
FITC-A-	94.9	45668
PE-A+	0.337	162
PE-A-	99.7	47936
PerCP-Cy5-5-A+	2.92	1403
PerCP-Cy5-5-A-	97.1	46695
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.16	77
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.651	313
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.102	49
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	99.1	47659
22_05_2011_231 controle_001.fcs		50000
Celulas	97	48495
FITC-A+	4.73	2294
FITC-A-	95.3	46201
PerCP-Cy5-5-A+	2.81	1364
PerCP-Cy5-5-A-	97.2	47131
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.169	82
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.612	297
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.103	50
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	99.1	48066
22_05_2011_435 CD14,2f,CD90_001.fcs		50000
Celulas	99.5	49733
FITC-A+	13.5	6738
FITC-A-	86.5	42995
PerCP-Cy5-5-A+	33.4	16604
PerCP-Cy5-5-A-	66.6	33129
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	1.14	565
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	4.49	2231
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	7.15	3558
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	87.2	43379
22_05_2011_435 CD14,2f,CD90.fcs		50000
Celulas	99.3	49670
FITC-A+	13.4	6633
FITC-A-	86.6	43037
PerCP-Cy5-5-A+	37.5	18619
PerCP-Cy5-5-A-	62.5	31051
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.932	463
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	4.53	2251
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	8.97	4455
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	85.6	42501
22_05_2011_435 CD14_001.fcs		50000
Celulas	99.2	49618
PerCP-Cy5-5-A+	38.8	19228
PerCP-Cy5-5-A-	61.2	30390
22_05_2011_435 CD14.fcs		50000

Celulas	99.3	49649
PerCP-Cy5-5-A+	38.6	19168
PerCP-Cy5-5-A-	61.4	30481
22_05_2011_435_CD90_001.fcs		50000
Celulas	98.8	49394
FITC-A+	13.6	6729
FITC-A-	86.4	42665
22_05_2011_435_CD90.fcs		50000
Celulas	98.4	49181
FITC-A+	15.5	7621
FITC-A-	84.5	41560
22_05_2011_435_IgG1.fcs		50000
Celulas	99.3	49641
FITC-A+	4.83	2397
FITC-A-	95.2	47244
22_05_2011_435_IgG2.fcs		50000
Celulas	98.9	49468
PE-A+	0.798	395
PE-A-	99.2	49073
22_05_2011_435_controle.fcs		50000
Celulas	97.2	48605
FITC-A+	3.21	1562
FITC-A-	96.8	47043
PE-A+	0.562	273
PE-A-	99.4	48332
PerCP-Cy5-5-A+	2.91	1413
PerCP-Cy5-5-A-	97.1	47192
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.274	133
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	0.885	430
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.097	47
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	98.7	47995
22_05_2011_435_controle_001.fcs		50000
Celulas	99.2	49591
FITC-A+	4.09	2027
FITC-A-	95.9	47564
PerCP-Cy5-5-A+	3.53	1751
PerCP-Cy5-5-A-	96.5	47840
Q1: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A+	0.45	223
Q2: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A+	1.22	603
Q3: PerCP-Cy5-5-A+ , FITC-A-	0.089	44
Q4: PerCP-Cy5-5-A- , FITC-A-	98.2	48721

Fourth Experiment:

Name	Statistic	#Cells
Specimen_001_Hs CD44,2f,CD90.fcs		50000
Cells	83.9	41968
APC-A+	64.1	26915
APC-A-	35.9	15053

FITC-A+	78.4	32899
FITC-A-	21.6	9069
Q1: APC-A- , FITC-A+	26	10914
Q2: APC-A+ , FITC-A+	38.2	16043
Q3: APC-A+ , FITC-A-	12.1	5095
Q4: APC-A- , FITC-A-	23.6	9916
Specimen_001_Hs CD44.fcs		50000
Cells	83.2	41589
APC-A+	60.7	25256
APC-A-	39.3	16324
Specimen_001_Hs CD90.fcs		50000
Cells	83	41502
FITC-A+	76.5	31733
FITC-A-	23.5	9769
Specimen_001_Hs Controle.fcs		50000
Cells	80.8	40378
APC-A+	0.688	278
APC-A-	99.3	40100
FITC-A+	2.68	1082
FITC-A-	97.3	39296
Q1: APC-A- , FITC-A+	0.949	383
Q2: APC-A+ , FITC-A+	0.099	40
Q3: APC-A+ , FITC-A-	0.074	30
Q4: APC-A- , FITC-A-	98.9	39925

Fifth Experiment:

Name	Statistic	#Cells
Specimen_001_MCF10A CD44,2f,CD90.fcs		15018
Cells	81.8	12284
APC-A+	95.7	11753
APC-A-	4.32	531
FITC-A+	2.48	305
FITC-A-	97.5	11979
Q1: APC-A- , FITC-A+	0.204	25
Q2: APC-A+ , FITC-A+	1.12	138
Q3: APC-A+ , FITC-A-	89.5	11000
Q4: APC-A- , FITC-A-	9.13	1121
Specimen_001_MCF10A CD44.fcs		12299
Cells	79.6	9794
APC-A+	95.4	9348
APC-A-	4.55	446
Specimen_001_MCF10A CD90.fcs		16014
Cells	80.9	12952
FITC-A+	2.63	341
FITC-A-	97.4	12611
Specimen_001_MCF10A Controle.fcs		30456
Cells	78.5	23920
APC-A+	0.957	229
APC-A-	99	23691

FITC-A+	0.665	159
FITC-A-	99.3	23761
Q1: APC-A- , FITC-A+	0.318	76
Q2: APC-A+ , FITC-A+	0.096	23
Q3: APC-A+ , FITC-A-	0.008	2
Q4: APC-A- , FITC-A-	99.6	23819

## 4.2 Compensation Details

Data from one subject were compensated into FlowJo (version 7.6.3 on a Macintosh OS X version 10.6.8) using the spillover matrices depicted below. Note these matrices correspond to samples from one experiment, namely, the third one. The presence of dot plots at a 45 degree incline would indicate that compensation was not adequate and there may be spectral overlap; however that apparently this is not the case as shown above. We attribute such distribution to the great heterogeneity of cancer cells. Also, as cells were not previously synchronized, there were representatives from each stage of cell cycle, a fact known to lead to such dispersed profiles

ICC experiment spillover matrix.

	APC-A	APC-Cy7-A	FITC-A	PE-A	PE-Cy7-A	PE-Texas R...	PerCP-Cy5-...
APC-A	100%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
APC-Cy7-A	0.00%	100%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
FITC-A	0.00%	0.00%	100%	0.00%	0.00%	0.00%	5.07%
PE-A	0.00%	0.00%	0.00%	100%	0.00%	0.00%	0.00%
PE-Cy7-A	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	100%	0.00%	0.00%
PE-Texas Red-A	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	100%	0.00%
PerCP-Cy5-5-A	0.00%	0.00%	14.8%	0.00%	0.00%	0.00%	100%

	APC-A	APC-Cy7-A	Alexa Fluor...	DAPI-A	FITC-A	PE-A	PE-Cy7-A	PE-Texas R...	PerCP-Cy5-...
APC-A	100%	0.00%	0.00%	0.00%	8.16%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
APC-Cy7-A	0.00%	100%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Alexa Fluor 430-A	0.00%	0.00%	100%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
DAPI-A	0.00%	0.00%	0.00%	100%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
FITC-A	5.06%	0.00%	0.00%	0.00%	100%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
PE-A	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	100%	0.00%	0.00%	0.00%
PE-Cy7-A	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	100%	0.00%	0.00%
PE-Texas Red-A	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	100%	0.00%
PerCP-Cy5-5-A	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	100%

### 4.3 Data Transformation Details

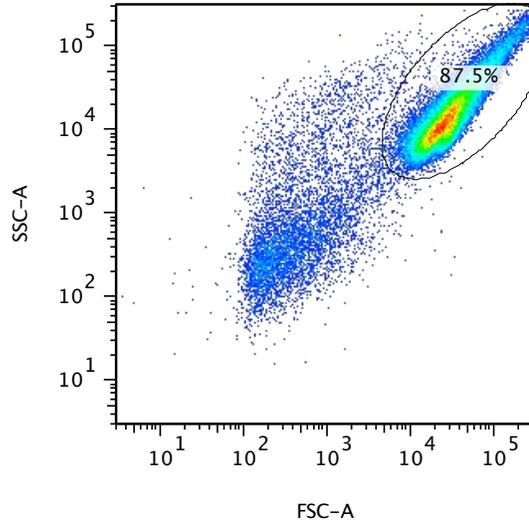
Not applicable.

### 4.4 Gating (Data Filtering) Details

Similar gating strategy was used for all the data files to identify the following antigen-presenting cell populations: CD90+ cells, CD90-cells, CD14+cells and CD14-cells, and also double staining. After drawing the gates to define each marker on a single sample, the same gating was applied to all samples on the FlowJo.

#### 4.4.1 Gate Description

First, the cells were separated in the FSC vs. SSC plot (as shown bellow). After gating, this population was analyzed against the CD90+ cells, CD90-cells, CD14+cells and CD14-cells, and also double staining. Thereby, the percentage of stained cells was analyzed as described in the 4.4.2 item.



#### 4.4.2 Gate Statistics

The following table shows percentages of each of the subpopulations defined by described gates. Percentages indicate % of parent gate, i.e. parent gate is denominator.

##### Histograms

Hs578-T - cells = 87.5%

CD90<sup>positive</sup> = 95.1%

CD90<sup>negative</sup> = 4.9%

CD14<sup>positive</sup> = 14.4%

CD14<sup>negative</sup> = 85.6%

MCF10-A - cells = 96.5%

CD90<sup>positive</sup> = 6.55%

CD90<sup>negative</sup> = 93.5%

CD14<sup>positive</sup> = 65.8%

CD14<sup>negative</sup> = 34.2%

##### Double Tagging

Hs578-T CD90/CD14 - cells = 89.0%

$$\text{CD90}^{\text{positive}}/\text{CD14}^{\text{negative}} = 70.3\%$$

$$\text{CD90}^{\text{positive}}/\text{CD14}^{\text{positive}} = 4.4\%$$

$$\text{CD90}^{\text{negative}}/\text{CD14}^{\text{positive}} = 0.0\%$$

$$\text{CD90}^{\text{negative}}/\text{CD14}^{\text{negative}} = 25.2\%$$

Hs578-T CD90/CD44 - cells = 83.9%

$$\text{CD90}^{\text{positive}}/\text{CD44}^{\text{negative}} = 26.0\%$$

$$\text{CD90}^{\text{positive}}/\text{CD44}^{\text{positive}} = 38.2\%$$

$$\text{CD90}^{\text{negative}}/\text{CD44}^{\text{positive}} = 12.1\%$$

$$\text{CD90}^{\text{negative}}/\text{CD44}^{\text{negative}} = 23.6\%$$

MCF10-A CD90/CD14 - cells = 96.2 %

$$\text{CD90}^{\text{positive}}/\text{CD14}^{\text{negative}} = 0.0 \%$$

$$\text{CD90}^{\text{positive}}/\text{CD14}^{\text{positive}} = 3.4\%$$

$$\text{CD90}^{\text{negative}}/\text{CD14}^{\text{positive}} = 24.3\%$$

$$\text{CD90}^{\text{negative}}/\text{CD14}^{\text{negative}} = 72.3\%$$

MCF10-A CD90/CD44 - cells = 81.8%

$$\text{CD90}^{\text{positive}}/\text{CD44}^{\text{negative}} = 0.2\%$$

$$\text{CD90}^{\text{positive}}/\text{CD44}^{\text{positive}} = 1.1\%$$

$$\text{CD90}^{\text{negative}}/\text{CD44}^{\text{positive}} = 89.5\%$$

$$\text{CD90}^{\text{negative}}/\text{CD44}^{\text{negative}} = 9.1\%$$

#### 4.4.3 Gate Boundaries

Gate boundaries as illustrated in Figure 2 of the accompanying main paper are recorded in the FlowJo workspace, which is available upon request for each of the subjects included in this study. Gate boundaries were adjusted according to the non-stained control cell fluorescence.

#### **4.4.4 Other relevant gate information**

Not applicable.